# HISTOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE BEOBACHTUNGEN AN TABAK-TUMORGEWEBEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

CHRISTINA GLASE
geb. Streit

aus

TRIER

BONN 1980

# HISTOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE BEOBACHTUNGEN AN TABAK-TUMORGEWEBEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

CHRISTINA GLASE
geb. Streit

aus

TRIER

BONN 1980

Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. F. Nienhaus
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Trüper

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 2. 1980

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meiner Mutter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS


| | Seite |
|---|---|
| 1. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT | 6 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 12 |
| 2.1. Anzucht des Pflanzenmaterials | 12 |
| 2.2. Inokulationstechnik | 12 |
| 2.3. Histologische Untersuchungen | 13 |
| 2.3.1. Frischschnittpräparate | 13 |
| 2.3.2. Paraffinschnittpräparate | 16 |
| 2.3.3. Peroxidasenachweis im Gewebe | 18 |
| 2.3.4. Nachweis von Polyphenoloxidasen | 19 |
| 2.3.5. Nachweis von o-Diphenolen | 20 |
| 2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese | 21 |
| 2.5. Dünnschichtchromatographie | 25 |
| 2.6. Exogene Wuchsstoffapplikationen | 26 |
| 3. ERGEBNISSE | 28 |
| 3.1. Vergleichende histologische Untersuchung nach Infektion durch einen Tumor-induzierenden Faktor und durch Agrobacterium tumefaciens an Nicotiana-Hybriden | 28 |
| 3.1.1. Spontantumoren | 50 |
| 3.2. Wundheilung und Tumorkonditionierungsphase | 54 |
| 3.3. Exogene Applikation von Wachstumsregulatoren | 57 |
| 3.3.1. Einfluß von unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen auf das Pflanzenwachstum | 58 |
| 3.3.2. Auswirkungen von Wachstumsregulatoren auf das Tumorwachstum | 62 |
| 3.3.2.1. Wuchsstoffapplikation 24 Stunden vor Infektion | 62 |
| 3.3.2.2. Phytohormonapplikation 6 Tage vor und nach Infektion | 66 |
| 3.3.3. Wirkung von Wachstumsregulatoren auf eine Infektionsrate mit 50% Tumorwachstum | 69 |
| 3.3.4. Abhängigkeit der Tumorentwicklung vom Pflanzenalter | 73 |
| 3.4. Untersuchungen über Peroxidase-Aktivitäten im Tabakgewebe | 75 |

3.4.1. Histochemische Untersuchungen über das Vorkommen von hitzestabilen PO-Isoenzymen 76
3.4.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von hitzestabilen PO-Isoenzymen 82
3.4.3. Trennung der Peroxidase in lösliche, ionisch und kovalent gebundene Isoenzyme 91
3.5. Histochemische Lokalisierung von Phenoloxidase im Tabakgewebe 93
3.6. Phenoluntersuchungen 96
3.6.1. Reagenzien zum Nachweis von Phenolen 96
3.6.2. O-Diphenol-Lokalisierung im Verlauf von Wundheilung und Tumorwachstum 97
3.6.3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Phenolen aus Gewebeextrakten im Verlauf von Wundheilung und Tumorentwicklung 103

4. DISKUSSION 112

5. ZUSAMMENFASSUNG 134

6. LITERATURVERZEICHNIS 135

## 1. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT

Wucherungen am Pflanzenkörper mit teilweisem oder totalem Verlust der typischen Gewebeorganisation sind ein weit verbreitetes Phänomen im Pflanzenreich. Derartige abnorme Bildungen können die unterschiedlichsten Ursachen haben. Sie reichen auf der einen Seite von den mehr oder weniger massigen, jedoch sich selbst begrenzenden Wundkalli bis zu den rapide wachsenden, sich nicht selbst beschränkenden, pathogenen Wucherungen auf der anderen Seite.
Als allgemein gültiges Kriterium für echtes Tumorwachstum gilt die Autonomie der Tumorzellen, deren Teilungs- und Wachstumsvorgänge sich der korrelativen Kontrolle durch den Wirtsorganismus weitgehend entzogen haben. Diese Zellen entwickeln sich in der Gewebekultur auch auf wuchsstoffreien Nährböden.
Eine Einführung in das Krebsproblem bei Pflanzen gibt BERGMANN (1964), eine ausführliche Abhandlung über Pflanzentumoren BEIDERBECK (1977).

Bisher sind die charakteristischen Tumormerkmale an drei Pflanzenkrebstypen genauer untersucht und beschrieben worden: 1. an den Wurzelhalsgallen (crown gall), 2. an der Wundtumorenkrankheit und 3. an den genetisch bedingten Tumoren. Einen Überblick über diese drei pflanzlichen Neoplasien geben BRAUN (1959) und BRAUN & STONIER (1958).

Umfangreiche Untersuchungen liegen zu der weit verbreiteten Crown-gall-Krankheit vor, die durch Wundinfektion mit Agrobacterium tumefaciens Sm. et. Towns. induziert wird (BRAUN, 1952; EICHIN, 1976; LIPPINCOTT & LIPPINCOTT, 1975; STAPP, 1956). Den weiten Wirtspflanzenkreis von Agrobacterium haben DE CLEENE & DE LEY (1976) zusammengestellt.
BRAUN (1962) untersuchte Beginn und Entwicklung dieser Krankheit. Histologische Beiträge über crown gall an verschiedenen Pflanzenarten lieferten COOK (1923), DAME (1938), KUPILA (1956, 1958, 1963) und RIKER (1923). Die tatsächliche Natur des tumorinduzierenden Faktors (TIF) an Agrobacterium tumefaciens ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Der TIF kann

zellfrei und sterilfiltriert an Möhrenscheibchen Tumoren erzeugen (ZUCK, 1975). Die Virulenz ist durch TI-Plasmide aus virulenten in avirulente Agrobacteriumstämme übertragbar (HAMILTON & CHOPAN, 1975; VAN LAREBEKE et al., 1974, 1975). Der Virulenz-Transfer ist jedoch wärmeempfindlich und gelingt bei einer Versuchstemperatur von 30° C (TEMPÉ et al., 1977) genausowenig wie die Tumorinduktion an der Pflanze selbst (LIPETZ, 1965).
Die ringförmigen TI-Plasmide, die ca. 4 % der gesamten Bakterien-DNA ausmachen (LEDERBOER et al., 1976), verleihen in der Regel einem Agrobacterium-Stamm neben der Virulenz (WATSON et al., 1975) auch die Fähigkeit, das Tumorgewebe zur Synthese von Octopin und/oder Nopalin anzuregen und diese Argininderivate wieder abzubauen (BOMHOFF et al., 1976). Ebenso ist die Empfindlichkeit gegenüber dem Bacteriocin Agrocin 84 an ein solches TI-Plasmid gebunden (ENGLER et al., 1975).

Eine nachweislich durch Viren hervorgerufene Tumorkrankheit fand BLACK (1945) an Klee. Das Wundtumoren-Virus (WTV) induziert Wucherungen an Papilionaceen, Compositen und Knöterichgewächsen.
Ursprung und Entwicklung der Virustumoren beschrieben KELLY & BLACK (1949). Histologische Untersuchungen liegen von LEE (1955a, 1955b, 1956) und von LEE & BLACK (1955) vor.
Die Bedeutung von Phytohormonen für die Tumorentwicklung untersuchte BLACK (1972). In einer Zusammenfassung charakterisiert BLACK (1970) das Wundtumorenvirus.

Spontan, ohne Induktion durch pathogene Organismen oder Agenzien, treten Tumorbildungen an Wurzeln und Stengeln bestimmter Pflanzenhybriden auf. KOSTOFF (1930) und LEVINE (1937) untersuchten den geweblichen Aufbau dieser Tumoren. Die Frage nach ihrer Ursache wurde ausführlich an Nicotiana-Hybriden erarbeitet. SMITH (1972) diskutiert als mutmaßlichen Auslöser eine Störung der normalen Genregulation.

1971 entdeckte NIENHAUS in den Anzuchten des Department of Plant Pathology der University of California, Berkeley, USA, teratomartige Zellprogressionen an der Sproßbasis von Nicoti-

ana clevelandii. Es gelang, dieses tumorauslösende Prinzip bakterienfrei auf gesunde Pflanzen zu übertragen. Aufgrund der Arbeiten von GLIEM (1973) und NIENHAUS & GLIEM (1973) wurde als tumorinduzierender Faktor ein bisher noch nicht beschriebenes, mechanisch übertragbares, onkogenes Virus angenommen und als Tabak-Tumor-Virus (TTV) bezeichnet. GLIEM (1977) untersuchte die Cytologie dieser Tumoren und stellte eine anomale Plastidenentwicklung fest. VOGEL (1976) grenzte den Wirtspflanzenkreis dieses Virus ein. Die Wuchsstoffautonomie der Tumorzellen auf aseptischen, wuchsstoffreien Nährmedien bewiesen MISRA & NIENHAUS (1976). Über mögliche Beeinflussungen der Virussynthese einerseits und der Tumorentwicklung andererseits durch Antibiotika arbeitete VOM BERGE UND HERRENDORFF (1977). WEGEN (1976) untersuchte gelelektrophoretisch das Isoenzymmuster der Peroxidase in gesunden und infizierten tumorbildenden Tabakgeweben. Jüngste Untersuchungen von KORNAU (1978) aus zur Zeit in Bonn kultiviertem Tumormaterial konnten die Virusursache nicht mehr nachweisen. Seine Ergebnisse deuten auf eine Tumorinduktion durch Corynebacterium fascians hin. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit lediglich von einem tumorinduzierenden Faktor (TIF) gesprochen.

In den zahlreichen Stoffwechseluntersuchungen an tumorbildenden Pflanzen treten besonders Arbeiten über Enzymaktivitäten im Gewebe in den Vordergrund, die einerseits Krankheitszustände anzeigen können, andererseits an der Regulation des Phytohormonhaushaltes mitbeteiligt sind. Diese Funktionen erfüllen die Oxidasen, insbesondere Peroxidasen. Verletzungen und Infektionen führen häufig zu einer veränderten, meist erhöhten Peroxidaseaktivität. LOEBENSTEIN & LINDSEY (1961), FARKAS & STAHMANN (1966), BATES & CHANT (1970), NIENHAUS & HOOGEN (1970), sowie BIRECKA et al. (1975) bestätigten diese Beobachtungen an virusinfizierten Pflanzen. Als mögliche Erklärung für die erhöhte Peroxidase-Aktivität in verletzten und infizierten Pflanzen nahmen DESZI et al. (1970) die Anreicherung von Pipecolinsäure im Gewebe an. Andere Autoren konnten neben quantitativen auch qualitative Veränderungen im Isoenzymmuster von Peroxidasen beobachten. SCHIPPER (1975) und SRIDHAR

(1978) entdeckten nach Pilzinfektionen neu synthetisierte pflanzliche Isoenzyme. Ebenso beschrieb CURTIS (1971) an mit Agrobacterium tumefaciens infizierten Bohnenblättern quantitative und qualitative Veränderungen der Isoenzym-Aktivitäten, während MÄDER (1974) nach derartigen Infektionen an Tabakgeweben keine qualitative Änderung des Isoenzymmusters feststellte. MÄDER (1974) und MÄDER et al. (1975, 1976) verglichen elektrophoretisch ermittelte Isoenzymmuster mit Peroxidaseaktivitäten im Gewebe nach histochemischer Anfärbung.

Die Peroxidase gilt als ein Schlüsselenzym in der Phytohormonregulation, ohne daß bisher genaue Kenntnisse über ihre Wirkungsweise vorliegen. Allerdings konnte die Oxidation des Phytohormons Indolessigsäure (IAA) durch Peroxidase in zahlreichen Versuchen bestätigt werden (GASPAR & DINANT, 1966; KENTEN, 1955; MEUDT, 1967; PILET & GALSTON, 1955). In der Literatur wird deshalb die IAA abbauende Oxidase als identisch mit Peroxidase angesehen. LIPETZ & GALSTON (1959) vermochten Peroxidase- und IAA-Oxidase-Aktivität nicht voneinander zu trennen. DARBYSHIRE (1973) vermutete, daß beide Aktivitäten in einem Molekül lokalisiert sind. Neuere Untersuchungen von SRIVASTAVA & VAN HUYSTEE (1977) ergaben, daß das Holoenzym Peroxidase in einen Häm-Anteil mit Peroxidase- und Polyphenoloxidase-Aktivität und ein Apoenzym mit IAA-Oxidase- und Polyphenoloxidase-Funktion getrennt werden kann. Damit gelang den Autoren der Beweis ihrer bereits 1973 geäußerten Vermutung über eine Dreifach-Aktivität der Peroxidase, nämlich Peroxidase-, IAA-Oxidase- und Polyphenoloxidase-Funktion in einem Molekül.

Für das normale Wachstum eines pflanzlichen Gewebes ist eine spezifische IAA-Konzentration Voraussetzung. Zur Einstellung dieses endogenen Hormonspiegels trägt das Verhältnis zwischen IAA-Synthese und IAA-Abbau wesentlich bei (HESS, 1974). Daher kommt der Peroxidase bzw. IAA-Oxidase bei der Regulation des Wachstums eine bedeutende Funktion zu.
Tumorgewebe zeichnen sich gegenüber ihrem Wirtsgewebe in der Regel durch einen erhöhten Gehalt an IAA und weiteren Indolderivaten aus (DYE et al., 1962). BITANCOURT (1954) konnte in

Agrobacterium-induzierten Tumoren von Nicotiana und Salix eine um 10-fach erhöhte IAA-Konzentration im Vergleich zum normalen Gewebe nachweisen. Desgleichen fanden EL KHALIFA & ABU REISH (1975) und SKOOG (1944) eine Konzentrationserhöhung von IAA in genetisch bedingten Tumoren.
Die Frage nach dem Regulationsmechanismus für die Auxin-Überproduktion in Tumoren führte zu der Untersuchung des enzymatischen Abbaus einerseits und dem Nachweis phenolischer Substanzen andererseits. Über eine Hemmung der durch Peroxidase katalysierten IAA-Oxidation durch Phenole berichteten SCHAEFFER et al. (1967) und EMSWELLER et al. (1962). BROWN & TENNISWOOD (1974) wiesen in bakteriell transformiertem Nicotiana-Gewebe erhöhte Scopoletin- und Cumarin-Spiegel nach. In genetisch bedingten Tumoren ist nach TSO et al. (1964, 1967) der Scopoletin- und Scopolin-Gehalt deutlich erhöht. Die Arbeit von RABIN & KLEIN (1957) bewies, daß Chlorogensäure als ein kompetitiver Inhibitor für IAA-Oxidase wirkt.
Allgemein sollen Monophenole die IAA-Oxidase-Aktivität fördern, Di- und Polyphenole dagegen inhibieren (HESS, 1974).

TURETSKAYA & KEFELI (1963) schlossen daraus, daß bei Reduktion des enzymatischen IAA-Abbaus sich der IAA-Spiegel in dem betreffenden Gewebe erhöht. Dabei wird nicht ausgeschlossen, daß zusätzlich auch eine erhöhte IAA-Synthese vorliegen kann.

Tumorwachstum ist jedoch nicht nur das Ergebnis eines entgleisten Indolderivat-Stoffwechsels. Weitere Phytohormone (Gibberelline und Cytokinine) müssen dabei ebenfalls berücksichtigt werden. Über die Gibberellinwirkung bei Tumorentwicklung liegen nur wenige Arbeiten vor. Nach KUPILA-AHVENNIEMI & HUHTELIN (1974) reagierten Crown-gall-Tumoren an Erbsenpflanzen nach künstlicher Gibberellinbehandlung mit verstärktem Wachstum.

Eine wichtige Funktion wird den Cytokininen während der erhöhten mitotischen Aktivität der neoplastischen Zellen zugesprochen (BEIDERBECK, 1973). KARSTEN (1966) beschrieb starke kinetinartige Wirkungen, die von Agrobacterium-Tumoren ausgehen und bestätigte, daß diese Krebszellen Cytokinine anreichern.

Weiterhin wird auch die Tumormorphologie selbst durch das Verhältnis der endogenen Wachstumsregulatoren zueinander ausgeprägt. Die Beziehungen zwischen nicht organisiertem bzw. organoidem Wachstum transformierter Zellen wurden an Nicotiana von SKOOG & MILLER (1957) untersucht. Danach war die morphologische Ausgestaltung des Tumors größtenteils bedingt durch das relative Auxin-Cytokinin-Verhältnis: hoher Auxin- gegenüber niedrigem Cytokiningehalt verursachte amorphe Neoplasien, während das umgekehrte Verhältnis zu Teratomen führte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die durch den TIF an Nicotiana-Hybriden verursachte Tumorentwicklung morphologisch und histologisch von Agrobacterium-Neoplasien abzugrenzen und zu untersuchen, von welchen Zellen oder Geweben die Wucherungen ausgehen können. Exogene Phytohormonbehandlungen, sowie Beobachtungen von Peroxidase-Aktivitäten und Phenolvorkommen in gesunden, infizierten und neoplastischen Geweben sollten Anhaltspunkte über eventuelle Hormonkonzentrationen im Tumor und über Wege der Wuchsstoffregulation geben.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Anzucht des Pflanzenmaterials

Alle Versuche wurden mit den Tabakhybriden, Nicotiana glutinosa x Nicotiana clevelandii, wegen ihrer problemlosen Anzucht und hohen Empfindlichkeit für das TIP (tumorinduzierende Prinzip) ausgeführt.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte aus Samen in Ton-Torf-Einheitserde (Typ P und T; Fa. Balster).
Die Temperatur in den Klimakammern und Gewächshäusern lag zwischen 20° C und 24° C, die relative Luftfeuchte zwischen 60 und 80 %.
Das Erblühen und damit einhergehende raschere Altern der Pflanzen wurde durch strikte Einhaltung von Kurztagsbedingungen mit zwölfstündigem Licht- Dunkelwechsel stark verzögert. Ebenso behielten diese Pflanzen lange Zeit ihre Rosettenwuchsform, während sie unter normalen Lichtverhältnissen, besonders bei Langtagbedingungen, sehr viel schneller schossen.

Für einige Versuche wurden zusätzlich Datura stramonium L. als Testpflanzen genommen.

### 2.2. Inokulationstechnik

Zur Inokulation der Testpflanzen wurden Tumoren von infizierten Pflanzen abgetrennt und mit unterschiedlichen Mengen Na-Phosphatpuffer (0,01 M, pH 6,5, steril) in einer sterilisierten Reibschale homogenisiert. Grobe Gewebebestandteile wurden durch Auspressen durch ein doppelt gelegtes steriles Mulltuch entfernt. Der resultierende Rohpreßsaft diente als Inokulum.
Auch tiefgefrorenes Material wurde verwendet, nachdem festgestellt worden war, daß durch Gefrieren und Auftauen keine Infektionsminderung auftrat.
Die Infektion erfolgte ca. 8 Wochen nach der Aussaat durch mechanische Preßsaftübertragung mit Hilfe einer sterilen Spritze (Einmalkanüle No. 18, 0,5x25 mm).

Verwundet und infiziert wurden die Pflanzen an der Sproßbasis, in den Blattachseln und am Vegetationspunkt. Um Anfangsstadien der Tumorbildungen besser von Wundheilungsphänomenen differenzieren zu können, wurden parallel dazu Kontrollpflanzen nur mit sterilem Puffer verwundet.
Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchungen diente ein von NIENHAUS 1971 in Berkeley (Kalifornien) an Nicotiana clevelandii-Pflanzen entdecktes Teratom, dessen tumorinduzierender Faktor (TIF) seither im Institut für Pflanzenkrankheiten, Bonn an Tabakhybriden weiter kultiviert wurde. Der TIF ist von NIENHAUS & GLIEM (1973) als isodiametrisches Virus mit einem Durchmesser von 20 nm beschrieben und als Tabak-Tumor-Virus bezeichnet worden.

Agrobacterium tumefaciens-Infektionen wurden mit dem agressiven Stamm Nr. 147 von Professor KERN (Kernforschungsanlage, Jülich) durchgeführt. Die Weiterkultivierung dieses Stammes erfolgte an Datura stramonium L. und an Nicotianahybriden.

Durchschnittlich 1 Woche nach Agrobacterium-Infektion und etwa 2 Wochen nach Inokulation mit Tabak-Tumor-Preßsaft zeigten sich erste Tumorbildungen, die nach weiteren 2 Wochen ihre höchsten Entwicklungsstufe erreicht hatten.

## 2.3. Histologische Untersuchungen

### 2.3.1. Frischschnittpräparate

Nach Versuchsbeginn wurden im Abstand von 2-4 Tagen jeweils infizierte und pufferinokulierte Pflanzen auf histologische Veränderungen bis zum Abschluß der Tumorentwicklung untersucht.
Frischpräparate (Hand- oder Gefriermikrotomschnitte) wurden ohne weitere Behandlung oder zur besseren Differenzierung von Geweben und Zellinhaltsstoffen nach Behandlung mit Phloroglucin-HCl (Ligninnachweis), Resorcinlösung (Kallosenachweis) und mit Jodjodkalium (Stärkefärbung) nach Anleitungen von GERLACH (1969) und NIENHAUS (1969) lichtmikroskopisch untersucht.

Zum Ligninnachweis waren 1-5 g Phloroglucin in 100 ml 92%igem Äthanol aufzulösen, die Gewebeschnitte darin 2 Minuten zu behandeln, die Lösung anschließend mit Filterpapier abzusaugen, durch einige Tropfen rauchende Salzsäure zu ersetzen und nach einigen Minuten Einwirkungszeit (Rotfärbung von Ligninbestandteilen) die Farbreagenz mit Wasser auszuwaschen.

Die Resorcinblaulösung wurde aus 1 g Resorcin in 100 ml Aqua dest. und wenigen Tropfen einer 25%igen $NH_4$-Lösung hergestellt. Die hellblaue Farbreaktion trat innerhalb von 5 Minuten auf. Zur mikroskopischen Untersuchung waren die Schnitte in Wasser zu waschen.

Die Herstellung von Jodjodkali-Lösung erfolgte aus 3 g KJ und 7 g J in 100 ml 92%igem Äthanol. Nach ca. 5 Minuten wurden Schnitte mit Wasser gewaschen. Stärkekörner waren violett-blau gefärbt.

Zu fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden nach JENSEN (1962) Frischschnitte für 10 Minuten in 0,005%iger wässriger Anilinblaulösung, hergestellt in 0,15 M $K_2HPO_4$, pH 8,2, behandelt. Die zunächst blaue Lösung verliert ihre Farbe innerhalb weniger Stunden, ohne daß sich dadurch die Färbekraft verringert. Die Präparate wurden in dieser Lösung in einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Laborlux M) unter Verwendung von Erregerfilter UG 1 (2 mm), Rotdämpfungsfilter BG 38 (4 mm) und Sperrfilter K 460 untersucht.

Für weitere Färbungen waren die Frischschnitte zu fixieren. Als Fixierungmittel dienten 10%iges Formalin oder FAA-Lösung (5 ml 40%iges Formalin, 5 ml Essigsäure, 90 ml 50%iges Äthanol). Die Fixierungszeit betrug mindestens 4 Stunden.

FAA-Fixierung war für eine Safranin-Kristallviolett-Lichtgrünfärbung (GERLACH, 1969) erforderlich. Hierzu waren 3 Farblösungen anzusetzen:
Lösung A: 1 g Safranin in 33 ml 50%igem unvergälltem Äthanol,
Lösung B: 0,5 g Kristallviolett in 50 ml Aqua dest., filtriert,
Lösung C: 0,25 g Lichtgrün in 50 ml 95%igem unvergälltem Äthanol.
Vor der Färbung mußten die Schnitte 3 Minuten in 92%igem

Alkohol inkubiert werden. Anschließend kamen sie in die Safranin-Lösung, die nach einstündiger Färbedauer unter fließendem Leitungswasser wieder auszuspülen war. Etwa 3 Minuten dauerte die anschließende Kristallviolettfärbung, die durch gründliches Spülen in Aqua dest. beendet wurde. Dann wurden die Schnitte auf einen Objektträger übertragen und solange mit 92%igem unvergälltem Äthanol überschichtet, bis keine violette Farbe mehr austrat. Die dritte Färbung mit Lichtgrün wurde nach maximal 1 Minute Einwirkzeit durch Zugabe von Isopropylalkohol unterbrochen und mit diesem Alkohol solange nachgewaschen, bis keine Farbe mehr austrat.

Eine Fixierung mit 10%igem Formalin erfolgte vor Methylgrün-Pyronin-Färbung nach BRACHET (in GERLACH, 1969) in abgeänderter Form.
0,2 g Methylgrün wurde in 100 ml Aqua dest. gelöst. Um die meist vorhandene Verunreinigung mit Methylviolett zu entfernen, mußte die Farblösung solange mit Chloroform im Scheidetrichter ausgeschüttelt werden, bis sich im Chloroform kein violetter Farbstoff mehr löste. Von Pyronin wurde eine 0,5%ige wässrige Lösung hergestellt.
Die Farblösung nach BRACHET setzte sich aus 10 ml reinem Methylgrün, 17,5 ml Pyroninlösung und 250 ml Aqua dest. zusammen, die im Verhältnis 1:1 mit Citratpuffer (0,15 M, pH 5) gemischt wurde. Zur Färbung wurden die Formalin-fixierten Schnitte nach Waschen in Aqua dest. kurzzeitig in Citratpuffer (0,15 M, pH 7)gelegt und anschließend etwa 2 Stunden im Farblösung-Puffergemisch gefärbt, für ca. 3 Sekunden in Aqua dest. ausgewaschen und nach Absaugen des Wassers mit Filterpapier sofort in absolutem Aceton dehydriert (zweimalige Behandlung). Die weitere Entwässerung der Präparate erfolgte zuerst mit einem Xylol-Aceton-Gemisch (Verhältnis 1:1), dann mit einem Gemisch mit 10% Acetonanteil und schließlich mit reinem Xylol.

2.3.2. Paraffinschnittpräparate

Gewebeeinbettung in Paraffin führte zu dünneren und gleichmäßigeren Gewebeschnitten als bei Frischpräparaten.

Tumorgewebe wurde in ca. 5 x 5 mm kleine Stücke zerlegt und dann im Vakuum in AFE-Fixierungslösung (90 ml 70%igem Alkohol, 5 ml Eisessig, 5 ml 35-40%iges Formaldehyd) entlüftet und fixiert.
Die Gewebeproben wurden für weitere 24 Stunden in erneuerter AFE-Lösung belassen, mehrere Stunden in fließendem Leitungswasser gewaschen und dann stufenweise nach folgendem Plan entwässert und paraffinisiert:
Entwässerung in vergälltem Alkohol: 2x 70% (jeweils 20'), 80% (20'), 92% (20'), 96% (20') und 3x 100% (30', 60' bzw. 360').
100%iger Alkohol : Toluol: 3:1 (30'), 1:1 (30') und 1:3 (30'). 3x Toluol (jeweils 30').
Paraffinisierung: Toluol : Paraffin bei 40° C: 3:1 (30'), 1:1 (45') und 1:3 (60'); 3x Paraffin (45', 120' bzw. 240').
Für die vorliegenden Untersuchungen eignete sich Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 65° C am besten. Vor Verwendung mußte das verflüssigte Paraffin von Verunreinigungen durch Filtrieren befreit werden. Alle Paraffininfiltrationsvorgänge waren möglichst im Brutschrank bei mindestens 40° C auszuführen, damit die Paraffingemische und das reine Paraffin homogen verflüssigt blieben.

Einbettung: Auf einer sauberen Glasplatte wurde in einer Form aus 2 Metallwinkeln flüssiges Paraffin ausgegossen und die Paraffin-infiltrierten Objekte nebeneinander darin eingelegt. Nach dem Erstarren wurden die einzelnen Objekte in Blockform mit einer erhitzten Rasierklinge voneinander getrennt und die Paraffinblöckchen auf paraffingetränkte Holzblöcke angeschmolzen und stabilisiert. Dann waren die Paraffinblöcke in Pyramidenform für das Mikrotom zu trimmen.

Schneiden: Die Holzblöcke wurden in den Halter des Rotationsmikrotoms (Großes Serienmikrotom, Mod. 1130, Fa. Jung) eingespannt, so daß das Mikrotommesser von der angetrimmten

Spitze des Paraffinblockes Serienschnitte abschneiden konnte. Die Paraffinschnitte hatten eine Dicke von 10 µ.
Diese Schnittbänder kamen mit der glänzenden Bandseite nach unten auf entfettete und mit Albuminlösung beschichtete Objektträger. Die parallel angeordneten Schnittbänder wurden mit Aqua dest. unterschichtet und kamen dann zur Streckung auf eine Wärmebank (65° C). Nach dem Verdunsten des Wassers waren die Schnitte auf dem Objektträger fixiert.
Für die anschließenden Färbungen mußten die Schnitte wieder nach folgendem Plan entparaffinisiert werden:
3x Toluol (10', 5' bzw. 5'), 3x absoluter Alkohol (jeweils 3'), 90%iger Alkohol (2') und 70%iger Alkohol (2').
Die Paraffinschnitte wurden entweder mit Giemsalösung oder mit Safranin-Lichtgrünlösung (GERLACH, 1969) gefärbt.
Zur Giemsafärbung war eine unverdünnte Giemsalösung rein zu filtrieren und darin die auf Objektträgern fixierten Schnitte 7 Minuten zu inkubieren und anschließend in Aqua dest. mit einem pH-Wert von genau 7 vier mal je 10 Minuten zu waschen. Dann folgte kurzes Eintauchen in absolutem Alkohol und vorsichtiges Überschichten mit Nelkenöl solange, bis sich kaum noch grüne Farbe löste.
Eine 3-fache Behandlung mit Xylol (jeweils 1') folgte vor Einbettung in Kanadabalsam.

Für die Doppelfärbung war 1 g Safranin in 100 ml 50%igem Alkohol aufzulösen, darin die Schnitte für 6 - 24 Stunden zu behandeln und dann mit Leitungswasser solange nachzuspülen, bis keine Farbwolken mehr aufstiegen.
Mit 92%igem Alkohol war nachzuwaschen bis alle Schlieren beseitigt waren. Anschließend erfolgte eine zweite Färbung mit Lichtgrün (0,5 g in 100 ml 50%igem Alkohol) für 5 - 10 Sekunden.
Diese Färbung wurde durch kurze Behandlung mit Isopropanol (1x 95%, 3x 100% Isopropanol) abgebrochen. Darauf folgte 3maliges Waschen in Toluol und Einbettung in Kanadabalsam.

2.3.3. Peroxidasenachweis im Gewebe

Von zahlreichen Methoden zur Anfärbung von Peroxidase im Gewebe erwies sich die nach VAN DUIJN (1955) in etwas abgewandelter Form für diese Versuche am geeignetesten. Dazu waren folgende Reagenzien herzustellen:

1. gesättigte wässrige Lösung von Benzidin: 50 mg Benzidin wurden in 200 ml Aqua bidest. bei 80° C aufgelöst, auf Zimmertemperatur abgekühlt und durch Filtration von Verunreinigungen befreit.
2. gesättigte Ammoniumchloridlösung: 40 g $NH_4Cl$ wurden in 100 ml heißem Aqua bidest. aufgelöst und abgekühlt.
3. 5%ige Lösung von Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) in Aqua bidest.; die Lösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.
4. 3%ige wässrige Lösung von Wasserstoffperoxyd ($H_2O_2$).

Benzidin ist das Substrat, das durch Peroxidase und $H_2O_2$ zu Benzidinblau und gegebenenfalls zu Benzidinbraun oxidiert wird. $NH_4Cl$ führt zur Stabilisierung der blauen Färbung durch Fällung von stabilen blauen Kristallen, wodurch jedoch gleichzeitig die PO-Lokalisierbarkeit begrenzt wird. EDTA hilft als Chelatbildner zur weiteren Stabilisierung des Färbeproduktes.

Zum Färbevorgang wurden Hand- oder Gefriermikrotomschnitte (60-100 µ) in 0,1 M Äthanol-Acetatpuffer (49 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 4,5 + 47 ml 96%iges Äthanol) vorfixiert. Dieser Puffer fixierte leicht ohne die Aktivität der Peroxidase-Isoenzyme erkennbar zu beeinträchtigen. Die vorbehandelten Schnitte wurden kurz angetrocknet und in das folgendermaßen zusammengesetzte Inkubationsgemisch übertragen:
1 ml $NH_4Cl$ + 1 ml EDTA + 9 ml Benzidinlösung. Dieses Reagenzgemisch war, ebenso wie die einzelnen Lösungen, über Monate stabil.
Nach 1 bis 2 Minuten Einwirkzeit wurde 0,1 ml $H_2O_2$ tropfenweise zugegeben. Da sich die ausgetretene Peroxidase im Färbemedium zuerst färbte, war dieser Färbevorgang so oft zu wiederholen, bis das Reaktionsmedium klar blieb und die

Reagenzien auf die in den Zellen vorhandenen Peroxidasen einwirken konnten. Zwischen jeder Neufärbung wurden die Schnitte kurz in Wasser gespült, um die äußerlich anhaftenden Benzidinkristalle zu entfernen.
Alle Peroxidase-aktiven Stellen färbten sich nach dieser Methode im Cytoplasma blau und in den Zellwänden blau bis violett.
Da nach dieser Methode keine differenzielle Anfärbung einzelner Isoenzyme möglich war, wurden die hitzelabilen Isoenzyme durch Behandlung der Gewebeschnitte bei 58° C ausgeschaltet.

Dazu kamen Hand- oder Gefrierschnitte in 58° C warmem Äthanol-Acetatpuffer für 10 Minuten. Der niedrige pH-Wert des Puffers setzte die Hitzestabilität der Isoenzyme herab und verhinderte gleichzeitig die Reaktivierung der Isoenzyme nach der Thermobehandlung.
Anschließend wurde sofort in Eiswasser abgekühlt und die Gewebe dem oben beschriebenen Färbeverfahren nach VAN DUIJN unterworfen.
Mikroskopisch untersucht wurden die Gewebe in der VAN DUIJN-Lösung ohne $H_2O_2$. Die Anfärbung blieb über Tage stabil.

2.3.4. Nachweis von Polyphenoloxidasen

O-Diphenole werden von o-Diphenol:$O_2$Oxidoreduktasen oxidiert. Weitere Synonyme hierfür sind Phenolase, Polyphenoloxidase, Tyrosinase, DOPA-Oxidase.
Zum Nachweis dieses Enzyms in Gewebeschnitten wurden folgende Methoden verwendet:

A. Nach BECKER et al. (1935) und RAPPAPORT (1955) in PEARSE (1972): Frischschnitte kamen für 1 Stunde in eine 0,1%ige DL-DOPA-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7-7,4 bei 37° C. War die Färbung zu schwach, so wurde die Lösung gewechselt und die Schnitte weiter inkubiert. Anschließend folgte Waschen der Präparate in Aqua dest.
Enzymlokalisationen waren durch schwärzlich-braune Granulate sichtbar.

B. Nach PRYOR & SCHWARTZ (1973) abgewandelte Methode: Hierzu waren Gewebeschnitte in einer 0,01 M Lösung von Brenzkatechin in 0,02 M Na-Acetatpuffer (pH 4,2) bei 37° C für ca. $1^{1}/2$ Stunden zu inkubieren und in Aqua dest. zu waschen.
Enzymaktivität wurde durch braune Granulate angezeigt.

C. Nach LISON (1960): Frischschnitte wurden 2-3 Stunden in 5%igem Formaldehyd fixiert, 5 Sekunden in Aqua bidest. gewaschen und anschließend in einer frischen 0,1%igen Lösung von L-DOPA in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) 3-4 Stunden bei 37° C inkubiert (25 ml DOPA-Lösung + 2 ml $PO_4$-Puffer).
Anschließend kamen die Schnitte kurz in verdünnten Alkohol und wurden in Aqua dest. mikroskopiert.
Enzymaktivitäten waren bräunlich markiert.

### 2.3.5. Nachweis von o-Diphenolen

O-Diphenole oder o-Dihydroxyphenole sind 2-wertige Phenole, deren 2 Hydroxylgruppen (OH-Gruppen) in ortho-Stellung direkt am Benzolkern gebunden sind. Zu dieser Phenolgruppe gehören Brenzkatechin, Kaffeesäure, Chlorogensäure, o-Cumarsäure und Quercetin.

Die Lokalisierung der o-Diphenole im Pflanzengewebe wurde nach der Methode von VORSATZ/HOEPFENER (1942); vergl. REEVE (1959) durchgeführt. Diese sog. Nitrosoreaktion erwies sich nach Prüfung mehrerer anderer Methoden am geeignetsten, da die Färbung besonders differenziert erschien.

Folgende Reagenzien waren anzusetzen:
1. 10%ige wässrige Na-nitrit-Lösung
2. 20%ige wässrige Harnstofflösung
3. 10%ige wässrige Essigsäurelösung
4. 2 N NaOH-Lösung

Zu frischen Handschnitten von mindestens 400 µ Dicke wurden nacheinander gleiche Volumina der Lösungen 1, 2 und 3 zugegeben. Innerhalb von 3-4 Minuten entwickelte sich ein Gas.

Gleichzeitig färbten sich Gewebebezirke gelb bis hellorange. Nach Zugabe von 2 Volumina NaOH (4) verfärbte sich diese gelbliche Reaktion sofort hell- bis dunkel-kirschrot, während andere Gewebebezirke rötlich-braune, orange oder gelbe Färbungen annahmen. Die rot reagierenden Gewebeteile hoben sich eindeutig vom restlichen Gewebe ab. Die Kirschrotfärbung ist charakteristisch für Brenzkatechin und seine Derivate wie z.B. Chlorogensäure.

Da Phenole selten als Einzelsubstanz, sondern meist als Gemisch mehrerer phenolischer Komponenten vorliegen, wurden Farbvergleiche mit reinen Phenollösungen vorgenommen.

Zu je 1 ml $10^{-3}$ M wässriger oder methanolischer Lösung von Brenzkatechin, Kaffeesäure, Chlorogensäure, o-Cumarsäure und Quercetin wurden jeweils 1 ml der ersten 3 Reagenzien nach VORSATZ/HOEPFNER und 2 ml NaOH zugegeben. Ebenso wurden auch Gemische dieser Phenollösungen geprüft.
Identische Farbreaktionen in Phenollösungen waren auch nach Zugabe von ARNOW's-Reagenz nach der Methode von JOHNSON & SCHAAL (1957) zu erzielen.
Zu 1 ml Probe kamen 1 ml 0,5 N HCl, 1 ml ARNOW's-Reagenz (10 g Na-molybdat + 10 g Na-nitrit in 100 ml Wasser), 10 ml Aqua bidest. und 2 ml 1 N NaOH.
Dieselbe Methode erschien auch zum Nachweis von o-Diphenolen im Gewebe geeignet, die Farbreaktion jedoch geringer und zeitlich verzögert.

## 2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese

Neben histochemischem Nachweis von Peroxidasen im Gewebe wurden Peroxidase-Isoenzyme im Extrakt differenziell durch kontinuierliche Elektrophorese aufgetrennt.

Zur Aufbereitung des Pflanzenmaterials und zur Proteinbestimmung wurde frisch abgeerntetes Pflanzenmaterial entsprechend den histochemischen Methoden mit der Hand in Schnitte zerlegt und diese in Äthanol-Acetatpuffer (0,1 M, pH 4,5) inkubiert. Ein Teil der Schnitte wurde für die Hitzebehandlung

in auf 58° C erwärmtem Puffer 10 Minuten inkubiert und danach sofort in Eiswasser abgekühlt. Zur Kontrolle kam der andere Teil der Schnitte in Puffer bei Zimmertemperatur.
Die Gewebeschnitte waren anschließend im Kühlraum mit vorgekühlten Reagenzien und Materialien weiter zu verarbeiten.

Auf 1 g Frischgewicht kamen 2,5 ml $PO_4$-Puffer (pH 7, 0,01 M + 1 N NaCl), sowie zur Abtrennung von phenolischen Substanzen 0,5 g unlösliches Polyvenylpyrrolidon (Polyclar AT). Das Ganze wurde in einer Reibschale homogenisiert und gröbere Bestandteile durch ein Mulltuch abgepreßt.
Eine Vorreinigung erfolgte durch niedertourige Zentrifugation bei 26 500 g in 10' und anschließender Ultrazentrifugation bei ca. 100 000 g in 60'.
Der Proteingehalt im Überstand wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt, da zum exakten Vergleich von Enzymaktivitäten in Kontroll- und infizierten Pflanzen und von hitzebehandelten und nicht hitzebehandelten Geweben von gleichen Proteinmengen ausgegangen werden mußte.

Die Methode nach LOWRY beruht auf einer Biuret-Reaktion des Proteins mit Kupferionen in alkalischer Lösung und der Reduktion von Phosphormolybdän - Phosphorwolfram - Reagenz (Folin - Ciocalteus - Reagenz) durch Tyrosin- und Tryptophanbestandteile aus dem Protein.
Verbessert wurde die Methode von EDREVA & COLAKOVA (1975), die erkannt hatten, daß Phenole ebenfalls mit den LOWRY-Reagenzien reagieren und somit den Proteinnachweis verfälschen. Deshalb wurde mit Trichloressigsäure (TCA) eine Proteinreinigung vorgeschaltet.
Hierzu wurde das Protein aus 0,2 ml geklärter Lösung mit 1 ml 10%iger TCA gefällt. Phenole und sonstige Substanzen blieben in Lösung. In 5 Minuten wurde bei 5000 rpm der Proteinniederschlag abzentrifugiert, in 0,2 ml 0,5 N NaOH gelöst und die Lösung ein zweites Mal mit TCA behandelt und das gefällte Protein nach erneuter Auflösung zur quantitativen Bestimmung verwendet. Als Reagenzien dienten:

1. a) $Na_2CO_3$ (2%ig in 0,1 N NaOH)
   b) Na- oder K-Tartrat (1%ige wässrige Lösung)
   c) $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (0,5%ige wässrige Lösung)

2. Folin - Ciocalteus - Reagenz,
vor Gebrauch 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt.
48 ml von a) wurden mit 1 ml von b) überschichtet und darauf 1 ml von c) zugegeben und dann vermischt. 5 ml der Mischung wurden dem Proteinniederschlag in den Reagenzgläsern zugesetzt (Kontrolle: 5 ml der Mischung ohne Protein), 10 Minuten inkubiert und jeweils 0,5 ml des 2. Reagenz zugegeben und nach wiederum 10 minütiger Reaktionszeit die Transmissionswerte bei 650 nm in einem Spektralphotometer der Fa. Medeor (Modell Eppendorf) gegen den Kontrollwert gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer vorher ermittelten Eichkurve mit Rinderserumalbumin bestimmt.

Die Trennung der Peroxidase-Isoenzyme in lösliche, ionisch und kovalent gebundene erfolgte nach der Methode von MÄDER (1974) in etwas abgeänderter Form. Zu 1 g frischem Pflanzenmaterial war 0,5 g Polyclar AT und 2,5 ml Na-Acetatpuffer (0,001 M, pH 4,5) zuzugeben und Preßsaft herzustellen. Grobe Gewebebestandteile und das Polyclar des Rohpreßsaftes waren in 15 Minuten bei 5000 rpm abzutrennen. Der Überstand wurde dann bei ca. 100000 g in 60 Minuten Zentrifugation gereinigt und dieser Überstand mit den löslichen Proteinen 12 Stunden gegen 1:10 verdünnten Extraktionspuffer im Kühlraum dialysiert.
Dieser Gesamtextrakt enthielt vor allem die löslichen PO-Isoenzyme. Die Sedimente der Zentrifugationen wurden 2 x mit verdünntem Puffer gewaschen, 3 x mit 1%iger Triton X-100-Lösung behandelt und solange mit Aqua bidest.(ca. 15-18 mal) nachgewaschen, bis keine PO-Aktivität mehr im Überstand nachweisbar war.
Die so gereinigten Zellwände kamen über Nacht in 5 ml 1 N NaCl-Lösung und wurden dann in 15 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert, der Überstand bei ca. 100 000 g in 60 Minuten geklärt und der resultierende Überstand 12 Stunden gegen 1:10 verdünnten Extraktionspuffer dialysiert.
Dieser NaCl-Extrakt enthielt vor allem die ionisch in der Zellwand gebundenen Isoenzyme.
Für die 3. Extraktion wurden die restlichen Zellwandsedimente nach Zentrifugation 3 x mit 1 N NaCl-Lösung nachgewaschen, dann 6-8 mal mit Aqua bidest. gespült und anschließend 4 Stun-

den in einer Pektinase-Cellulase-Lösung bei 20° C geschüttelt (Pektinase = Mazerozym R-10, Cellulase "Onozuka" R-10 von Yakult Biochemicals Co., LTD, jeweils 1%ig in 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,5).
Die mazerierten Gewebe wurden bei ca. 100 000 g 60 Minuten ultrazentrifugiert und ergaben ohne anschließende Dialyse den Mazerationsextrakt, worin sich vor allem kovalent in die Zellwand gebundene Isoenzyme befanden.

Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte in einem Acrylophorgerät der Fa. Pleuger, Belgien mit Beckman Duostaten.
Als Trägersubstanz diente 7,5%iges Polyacrylamid mit einer Porengröße von 50 Å.
Als Elektrophoresepuffer diente Tris-Glycin-Puffer pH 8,5 (3 g Tris-Hydroxymethylaminomethan und 14,4 g Glycin in 100 ml Aqua bidest, vor Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt).
Zur Gelpräparation wurden folgende Grundlösungen vorbereitet: 30 g in Chloroform umkristallisiertes Acrylamid und 0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid in 100 ml Aqua bidest., 1,6%ige 3-Dimethylaminopropionitril- Lösung in unverdünntem Tris-Glycin-Puffer (pH 8,5), 0,03%ige wässrige Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung und 0,48% Ammonium-Peroxidisulfat in 100 ml Aqua bidest.
Von den 4 Grundlösungen waren gleiche Volumina in der angegebenen Reihenfolge sorgfältig zu vermischen und jeweils ca. 1,8 ml dieses Gemisches in Elektrophorese-Röhrchen zu füllen. Jedes Röhrchen wurde mit 1:10 verdünntem Tris-Glycin-Puffer vorsichtig bis zum Rand überschichtet. Die Polymerisation erfolgte in 45 Minuten bei Zimmertemperatur. Die oberste nicht polymerisierte Schicht wurde von den Röhrchen abgesaugt, auf das Gel 0,1 ml Proteinlösung vermischt mit wenig Saccharose aufgetragen und mit verdünntem Puffer überschichtet. Die so vorbereiteten Röhrchen wurden in die Halterungen des oberen Elektrodengefäßes eingeführt und oberes sowie unteres Gefäß mit verdünntem Tris-Glycin-Puffer gefüllt, so daß die Trennröhrchen in beide Pufferlösungen reichten.
In 2 getrennten Durchgängen erfolgte eine anodische und eine kathodische Trennung bei 2° C. Die anodische Wanderung

dauerte 100 Minuten, die kathodische 120 Minuten. Es wurde mit einer konstanten Stromstärke von 4 mA pro Gel gearbeitet.

Nach Ablauf der Elektrophorese waren die Gele aus den Trennröhrchen herauszulösen und die Gele direkt auf Peroxidase-Isoenzyme nach der Methode nach ORNSTEIN (1963) in SCHRAUWEN (1966) anzufärben. Sie wurden bei Zimmertemperatur in Dunkelheit 15-30 Minuten in folgender PO-Nachweisreagenz-Lösung inkubiert:
100 ml 0,2 M Na-Acetatlösung, 25 ml Benzidin-Guajacol-Lösung (50 mg Benzidin + 135 mg Guajacol in 25 ml 10%iger Essigsäure), 10 ml 0,005 M Mangansulfat-Lösung und 10 ml 0,12%iges $H_2O_2$.
Nach Eintritt der Farbreaktion wurden die Gele in Aqua bidest. gespült und in 2%iger Essigsäure inkubiert. Die Auswertung erfolgte sofort bei 415 nm im Chromoscan-Densitometer (Fa. Joyce-Loebl & Co. Ltd.).
Zur exakteren Vergleichbarkeit der PO-Aktivitäten in Geweben und in Extrakten nach Elektrophorese wurden einige Gele in VAN DUIJN-Lösung behandelt. Reaktionen traten erst nach ca. 60 Minuten ein, ergaben jedoch weder qualitative noch quantitative Unterschiede. Daher wurden alle weiteren Gelanfärbungen aus Zeitgründen mit der ORNSTEIN/SCHRAUWEN-Methode durchgeführt.

## 2.5. Dünnschichtchromatographie

Nach Prüfung zahlreicher papier- und dünnschichtchromatographischer Methoden kombiniert mit den unterschiedlichsten Sorptions- und Fließmitteln nach STAHL (1967), erwies sich die folgende DC-Methode am geeignetsten für die beabsichtigte Phenol-Analyse.
Fettfreie Glasplatten (20 x 20 cm) wurden mit einem 0,5 mm dünnen Kieselgel Typ G-Belag beschichtet. Dazu waren 30 g Kieselgel in 60 ml Aqua bidest. aufzulösen und mit einem beweglichen Streichgerät (Desaga, Heidelberg) auszustreichen. Das Fließmittel bestand aus einem Gemisch von n- Butanol - Eisessig - Wasser im Verhältnis 4:1:1. 0,2g frisches Pflanzen-

material wurde 15-20 Minuten in 1 ml kaltem Methanol in einem kleinen Glashomogenisator zerrieben und anschließend durch einen mit 0,5 ml Methanol angefeuchteten Faltenfilter filtriert.
Phenolextraktion mit heißem Methanol ergab keine unterschiedlichen Extraktionsergebnisse. Jeweils 0,1 ml Extrakt wurde mit einer Spritze punktförmig auf die DC-Platte aufgetragen. Als phenolische Vergleichssubstanzen dienten $10^{-3}$ M Lösungen von Brenzkatechin, Chlorogensäure und Kaffeesäure.
Die Laufzeit bei eindimensionaler Chromatographie betrug 3 Stunden.
Die Auswertung der getrockneten Platten erfolgte zunächst im langwelligen UV-Licht (Fluotest, Hanau), wobei gleichzeitig eine Markierung der absorbierenden und fluoreszierenden Flecke vorgenommen wurde.
Die o-Diphenole, vor allem Chlorogensäure, wurden durch Ansprühen der Platten mit 20%iger $Na_2CO_3$-Lösung und nach Trocknung durch Behandlung mit verdünnter Folin-Ciocalteus-Reagenz (1:3 mit Wasser verdünnt) sichtbar gemacht.
Ein Nachweis mit den für die Histochemie benutzten VORSATZ - HOEPFENER-Reagenzien gelang infolge starker Gasbildung, die das Kieselgel blasig auftrieb, nicht. Die Färbung war zudem verschwommen.
Zu jeder histochemischen Phenollokalisation wurde parallel eine solche Chromatographie durchgeführt.

## 2.6. Exogene Wuchsstoffapplikationen

Zur Herstellung von Hormonpasten wurde wasserfreies Lanolin bei $60^{\circ}$ C geschmolzen, eine abgewogene Menge an Wuchsstoffen darin aufgelöst und unter Rühren die Mischung erkalten gelassen. Die Hormonpasten waren in dunklen Glasgefäßen im Kühlschrank monatelang haltbar.
Verwendung fanden 0,05-2%ige Konzentrationen von Indol-3-essigsäure (IAA) (Fa. Merck), $\alpha$-Naphthylessigsäure (NAA) (Fa. Schuchardt), Kinetin = Furfurylaminopurin (Fa. Serva), Gibberellinsäure = Gibberellin-$A_3$ (Fa. Merck) sowie Kombinationen der einzelnen Hormone bei einem prozentualen Anteil

von jeweils 0,5-2%.
Die Versuchspflanzen wurden mit einer gut stecknadelkopfgroßen Pastenmenge (0,02 g) mittels eines Holzzahnstochers bestrichen.
Bei Nicotiana-Hybriden war wegen des Rosettenstadiums eine gleichmäßige Applikation erschwert. Deshalb erfolgte die Auftragung an 3 niveau- und abstandsgleichen Punkten an der sehr kurzen Sproßachse.
NAA und Gibberellin wurden, ebenso wie die NAA-Gibberellin-Kombination, stets an der Pflanzenspitze unterhalb der 3 jüngsten Blätter appliziert. In mittleren Sproßbereichen erfolgte die Auftragung der Kombinationen von NAA-Kinetin, Kinetin-Gibberellin und NAA-Kinetin-Gibberellin, und an der Sproßbasis die Kinetin-Applikation.

Wässrige Wuchsstofflösungen wurden in Konzentrationen von $10^{-4}$ bis $10^{-7}$% entweder zu jeweils 1 ml pro Pflanze aufgesprüht oder 0,1 ml/Blatt auf 4 Blättern pro Pflanze mit Hilfe eines Glasspatels aufgestrichen. Die Lösungen waren stets neu anzusetzen.

Da sichtbare Unterschiede in den Auswirkungen der verschiedenen Wuchsstoffapplikationsmethoden auf die Pflanzen nicht festzustellen waren, wurde wegen der besseren Handhabbarkeit der Paste den Vorzug gegeben, denn das Besprühen oder Bestreichen mußte alle 2-3 Tage wiederholt werden, während die Pastenkonzentration für 4-5 Wochen bei 1maliger Anwendung ausreichte.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Vergleichende histologische Untersuchung nach Infektion durch einen Tumor-induzierenden Faktor und durch Agrobacterium tumefaciens an Nicotiana-Hybriden

Lichtmikroskopisch wurden Entstehungsweise, Morphologie und Histologie der von zwei verschiedenen Erregern an Nicotiana glutinosa x Nicotiana clevelandii-Hybriden hervorgerufenen Wucherungen beobachtet.
Die mit Agrobacterium infizierten Pflanzen bildeten an allen inokulierten Kormusteilen deutliche Tumoren. Aus Vergleichsgründen mit der Tumorbildung nach Infektion durch einen Tumor-induzierenden Faktor (TIF) wird im folgenden jedoch nur über die Tumorentwicklung an der Sproßbasis und aus den Blattachseln berichtet.

Makroskopisch waren 2 Tage nach Verwundung mit sterilisiertem Phosphatpuffer weißliche Einstichlöcher am Sproß der Kontrollpflanzen zu beobachten. Durch diese Sproßstellen wurden Querschnitte angefertigt.
In Abbildung 1 ist das mikroskopische Bild eines solchen Querschnittes wiedergegeben: die Wunde war ein noch offener Stichkanal, der von zerstörten und nekrotisierenden Zellen gesäumt bis ins Markgewebe reichte. Zuweilen traten hypertrophierte Zellen am Wundrand auf. Einige dieser vergrößerten Zellen hatten sich bereits geteilt, wobei die resultierenden Querwände stets parallel zum Wundrand hin orientiert lagen.

Die mit TIF und Agrobacterium infizierten Pflanzen boten nach 2 Tagen makroskopisch und mikroskopisch ein gleichartiges Bild. Der nekrotisch gesäumte Stichkanal zeigte in seiner Umgebung nicht mehr Teilungsreaktionen als bei den Kontrollpflanzen.

In den steril verletzten Geweben konnte 4 Tage nach Pufferinokulation deutliche Wundreaktionen beobachtet werden.
Die von nekrotisierenden Zellfragmenten umgebenen Stichlöcher waren von mehr oder weniger breiten Zellstreifen eingefaßt. Dieses Wundgewebe schob die Öffnungen allmählich zu. Bereits

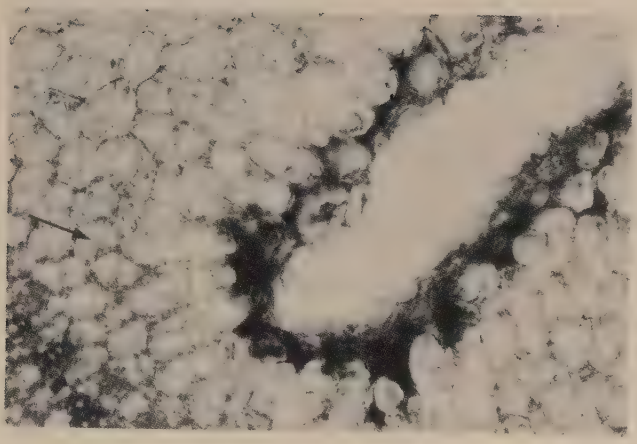


Abb. 1

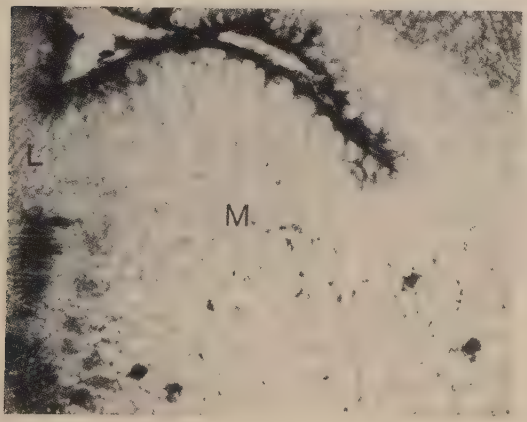



Abb. 2

Querschnitte durch den Sproß von Nicotiana-Hybriden

Abb. 1: 2 Tage nach Verwundung: Einstich ist gesäumt von vergrößerten und sich teilenden Zellen (Pfeil) des Markparenchyms (Vergr. 1:28)

Abb. 2: 4 Tage nach TIF-Infektion: Zellteilungen um die Wunde in Leit- (L) und Markparenchym (M) (Vergr. 1:14)

ausdifferenzierte Parenchymzellen wurden erneut teilungsfähig und teilten sich periklin zu den Nekrosen. Die Wundzellen waren, ihrer meristematischen Natur entsprechend, dünnwandig und schlossen interzellularfrei aneinander. Wundzellen, die vom Mark ausgingen, waren relativ groß, während diejenigen, die sich vom Leitgewebe -besonders vom Kambium- abteilten, relativ kleine Zellgrößen aufwiesen.

Auch in den mit TIF und Agrobacterium infizierten Pflanzen war der Wundheilungsprozess intensiv fortgeschritten, wobei allerdings noch kein histologisch erkennbarer Unterschied zu den Kontrollpflanzen auftrat. Wie aus der Abbildung 2 ersichtlich, hatte der Wundstimulus in diesen Pflanzen ebenfalls regelmäßige perikline Teilungen um die Wunden induziert. Nekrotisierende Xylemzellen wurden von konzentrischen Meristemscheiden umrandet (Abb. 3). In wenigen Pflanzen differenzierten sich bereits ältere Wundkalluszellen zu Wundtracheiden.

Makroskopisch waren 6-7 Tage nach Inokulation am Sproß der Kontrollpflanzen noch Stichlöcher zu sehen.
Im mikroskopischen Bild war jedoch erkennbar, daß der Einstich fast vollständig von Wundkallus zugedrückt und meist nur noch am Verlauf der nekrotischen Linie erkennbar blieb (schematisierte Abb. 4). In keiner der untersuchten Pflanzen wurde Wundtracheidbildung beobachtet.
Querschnitte durch Wundstellen an der Sproßbasis der mit TIF infizierten Pflanzen ergaben ähnliche Entwicklungen wie in den Kontrollpflanzen. Wie die Abb. 5 veranschaulicht, waren vom Einstich her noch einige abgestorbene und nekrotisierte Zellen zu sehen. Um diese Zone war eine Regeneration des Gewebes durch meristematische Zellen (M) eingeleitet worden. Am rechten Wundrand traten in Teilung begriffene Rindenparenchymzellen (R) auf, welche so die Wunde von der Seite her schlossen. In die Wundöffnung wurde eine Zellaustreibung von embryonalen Zellen des Rinden-, Mark- und Leitgewebes vorgeschoben. Im Leitbündelring selbst kam es wieder zu Zellteilungen um nekrotisierende Gefäße (L). Der Grund für diese scheinbar isoliert auftretenden Nekrosen bestand möglicherweise in Verletzungen, die oberhalb oder unterhalb des

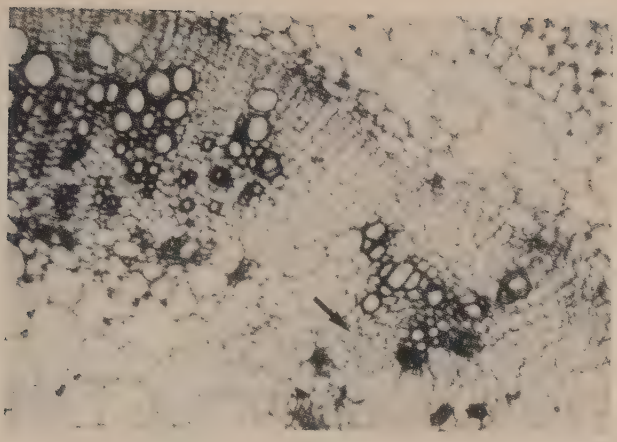


Abb. 3

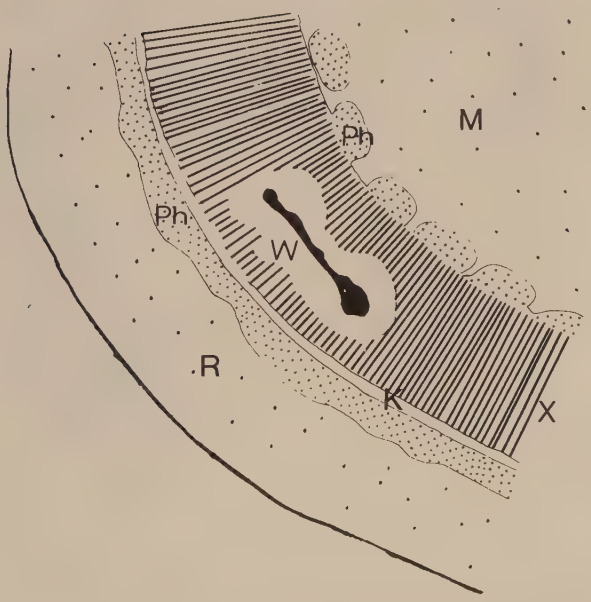



Abb. 4

Querschnitte durch den Sproß von Nicotiana-Hybriden

Abb. 3: 4 Tage nach Infektion mit A. tumefaciens: meristemat. Zellscheide um nekrotisierendes Xylem (Pfeil) (Vergr. 1:28)

Abb. 4: 7 Tage nach Verwundung: meristemat. Wundzellen (W) um eine Stichwunde im Xylem (X) (K = Kambium; M = Mark; Ph = Phloem; R = Rinde)

Abb. 5: Querschnitt durch den Tabakspro\u00df 7 Tage nach TIF-Infektion:
Wundheilung um Nekrosen im Mark (M);(R = Rinden-parenchym; L = Leitgewebe)

Schnittniveaus lagen. Die wundnahen Epidermiszellen erschienen gegenüber den übrigen epidermalen Zellen gestreckt und vergrößert. Teilungen dieser Zellen konnten niemals beobachtet werden.
Bis zu diesem Zeitpunkt nach TIF-Infektion ließ keine erkennbare Unregelmäßigkeit im Wundheilungsgeschehen, sei es im Gewebeaufbau oder in Form und Größe der Zellen, auf tumorartiges Wachstum schliessen. Dagegen war die Reaktion der Pflanzen auf Agrobacterium-Infektion bereits morphologisch an den sich leicht verdickenden Blattstielbasen zu erkennen.
Im mikroskopischen Bild (Abb. 6) waren die Einstiche, wie bei den Kontrollpflanzen, noch als braune Linien (N) sichtbar, die von Zellproliferationen (Z) zusammen gedrückt wurden. Wie außerdem in der Abbildung zu sehen ist, hatten sich im peripheren Wundzellbereich des Marks fortschreitend Wundtracheiden (WT) gebildet. Bei einigen Pflanzen schoben sich die Kalluszellen zur Sproßoberfläche, wobei Wundrandzellen nach außen hin hypertrophierten und insgesamt den Anfang einer Wucherung bildeten. Kleinere meristematische Zellkomplexe traten in Vielzahl im Rindengewebe auf.
Insgesamt ließ sich feststellen, daß ungefähr ab dem 6. Tag sowohl eine deutlich gesteigerte Wundheilung als auch erste, wohl krebsartige Irregularitäten in den mit Agrobacterium infizierten Pflanzen sichtbar wurden.

Die Wundheilung der Kontrollpflanzen 8 Tage nach Inokulation verlief ohne wesentliche Abweichung von der am 6. Tag beschriebenen Histologie. Die Wunden waren weitgehend mit Wundkallus ausgefüllt.
Auch die histologischen Verhältnisse waren denjenigen vom 6. Tag sehr ähnlich.
Die mit Agrobacterium infizierten Pflanzen dagegen unterschieden sich schon makroskopisch durch den angeschwollenen Sproß und die deutlich verdickten Blattstielbasen von den anderen Versuchspflanzen. Nekrotische Zellreste im Einstichbereich waren noch erkennbar. Das ursprünglich als Wundkallus angesprochene Regenerationsgewebe zeigte zunehmend Irregularitäten. Die normalerweise vorliegende Polarität der Zellteilungen wurde von Mitosen mit unregelmäßig angeordneten

Abb. 6: Querschnitt durch den Tabakssproß 6 Tage nach Infektion mit A. tumefaciens:
Wundheilungsgeschehen im Mark; (N = Nekrose, WT = Wundtracheiden)

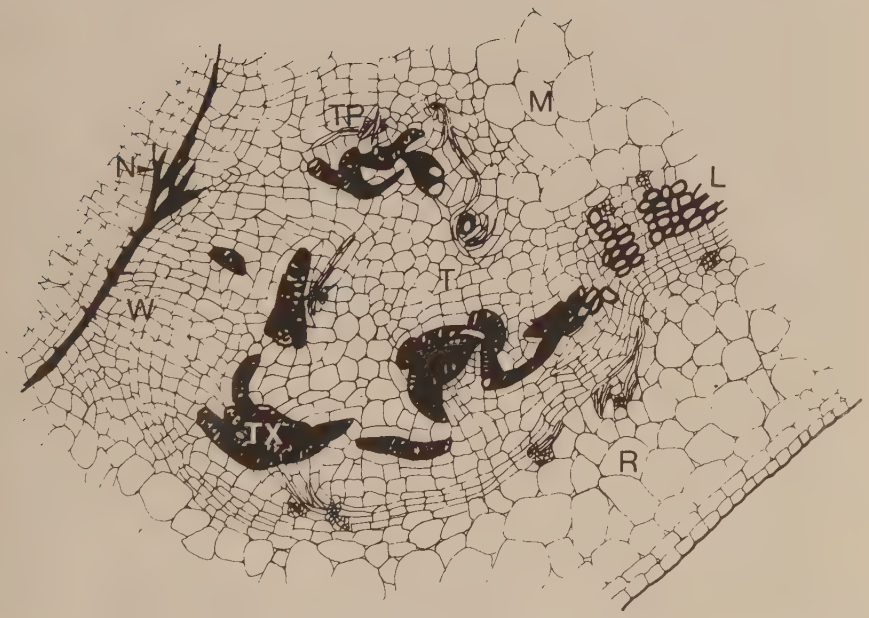



Abb. 7: Querschnitt durch den Tabaksproß 8 Tage nach Infektion mit A. tumefaciens:
Vom Wundkallus (W) ausgehender Tumor (T) eingelagert in Mark- (M), Leit- (L) und Rindengewebe (R);
(N = Nekrose; TP = Tumorphloem; TX = Tumorxylem)

Teilungsebenen abgelöst. Das proliferierende Gewebe drängte das Sproßleitgewebe stellenweise so sehr auseinander, daß dadurch Xylemelemente vereinzelt wurden und leicht den Anschein entarteten Wachstums vermittelten. Andererseits wurde auch Tumorxylem und Tumorphloem als einzelne anormal gestaltete Zellen oder Zellkomplexe in Knoten- oder Wirbelform, eingelagert in proliferierendes Tumorgewebe, differenziert. Die Abbildung 7 zeigt von Wundkallus (G) ausgehendes und sich ins Rindenparenchym vorschiebendes Tumorgewebe (T) mit anormalem Xylem (TX) und Phloem (TP). Sehr häufig waren im Rindengewebe kleine Zellkomplexe mit zentral gelegenem Xylem zu sehen. Derartige Bildungen können als Tumorinitialen angesehen werden. Sie wölbten schon in frühen Entwicklungsstadien die Epidermis pustelförmig nach außen (Abb. 8). Nicht immer konnte in der Nähe eines solchen Zentrums eine Verletzungsstelle lokalisiert werden.

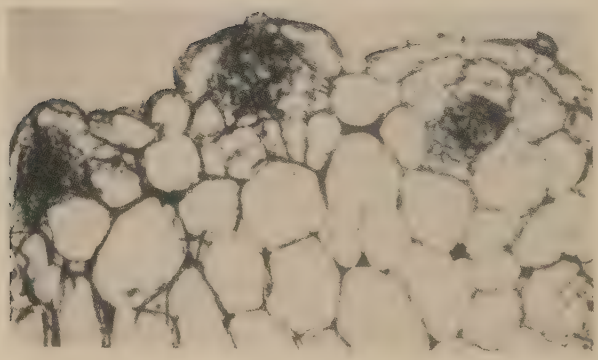


Abb. 8: Querschnitt durch den Tabaksproß 8 Tage nach Infektion mit A. tumefaciens: Tumorinitialen im peripheren Rindenbereich (Vergr. 1:40)

10-11 Tage nach Inokulation waren äußerlich an den mit Puffer inokulierten Kontrollpflanzen nur noch weiß-bräunliche Narben zu erkennen.
Im mikroskopischen Bild hatten parenchymatische Zellmassen die Stichlöcher vollständig ausgefüllt. Der Wundkallus konnte einen solchen Umfang erreichen, daß die Zellen des Leitgewebes weit auseinander gedrängt wurden. Dadurch fand auch im gesunden Gewebe eine teilweise recht starke Verzerrung der Histologie statt. An der Wundkallusbildung beteiligten sich immer die vom Wundreiz beeinflußten Zelltypen, die noch die Fähigkeit zur Dedifferenzierung und erneuten Teilung besaßen.

Die mit TIF infizierten Tabakpflanzen waren makroskopisch und mikroskopisch weiterhin mit den Kontrollen vergleichbar; allerdings setzte bei den infizierten Pflanzen ein verstärkter Seitenknospenaustrieb ein. An den meisten Pflanzen wurden an Sproß und Blattachseln winzige blattähnliche Ansätze erkennbar.

Nach Agrobacterium-Infektion war Tumorwachstum als knotige, hellgrüne Verdickung am gesamten Tabaksproß, besonders an der Sproßbasis, charakteristisch. Inokulierte Blattstiele erschienen ebenfalls stark angeschwollen. An den betroffenen Pflanzen starben zahlreiche Blätter ab. Erneuter Blattaustrieb führte oft zur Bildung von verkrüppelten, verdrillten, anomalen Zwergblättern, die sich fest und fleischig anfühlten. Diese Tumorblättchen hatten selbst meist keine lange Lebensdauer.
Die mikroskopischen Schnitte zeigten weitreichende Gewebeunregelmäßigkeiten durch Tumorproliferationen, die von allen Inokulationsstellen aus das normale Sproßgewebe auseinander drängte. Das Tumorwachstum ging überall unzweifelhaft von der Infektionsstelle aus. Die Tumorgewebe waren, abgesehen von frühen Stadien, niemals homogen in ihrer Struktur: groß- und kleinzellige Bereiche mit Differenzierungen in Form von normal und anomal aussehenden, einzeln vorliegenden oder gehäuft auftretenden Xylem- und Phloemzellen ergaben die charakteristische Histologie.

Abbildung 9 zeigt stark vermehrtes Phloem eines in den Sproß hineinreichenden Tumorgewebes.
Auch in diesem Stadium fielen wieder zahlreiche Tumorinitialen im Rindenparenchym auf. Diese zuerst kleinzelligen, meristematischen Nester differenzierten sehr rasch Xylem und Phloem. Welcher Zelltyp zuerst auftrat, war nicht zu entscheiden. Inwieweit die Phloemzellen Anomalitäten aufwiesen, ließ sich bei lichtmikroskopischer Vergrößerung nicht erkennen. Andererseits waren Verlauf und Anordnung der Tumorsiebzellen so unregelmäßig, daß dadurch eine normale Funktion des Stofftransportes kaum mehr gewährleistet sein dürfte. In Abbildung 10 ist eine solche Pustel wiedergegeben: ein zentrales Xylem wird von einer kambialen Schicht umrandet, an die sich unmittelbar nach außen hin ein mehr oder weniger geschlossener Ring aus Phloemelementen anschließt.

Der traumatische Reiz hatte 14 Tage nach Inokulation auch die Kontrollpflanzen zum Austrieb einiger Blattknospen angeregt. Hiermit schien die Wundheilung im Sproß allmählich abgeschlossen.
Im Vergleich zu den pufferinokulierten Kontrollpflanzen wuchsen in deutlich verstärktem Maße aus dem mit TIF infizierten Sproß Blättchen und blattähnliche Strukturen hervor. Sie befanden sich ebenso wie bei den Kontrollpflanzen stets im Bereich von Blattachseln oder von natürlichen Blattlücken im Leitzylinder, wo alte Blätter abgestorben waren und der Neuaustrieb als Folge des Wundreizes betrachtet werden konnte. In der Nähe dieser Austriebstellen waren immer Stichwunden lokalisiert. Die fortgeschrittenen Wundreaktionen glichen denjenigen der Kontrollen. Das Wundgewebe der mit TIF infizierten Pflanzen erschien jedoch allgemein stärker lignifiziert.
Einige der Blattstrukturen wurden von Leitzellen, die bereits Anschluß an den Zentralzylinder gefunden hatten, durchzogen. Diese "Blattprimordien" fielen jedoch durch verdickte Blattstiele sowie fehlende oder reduzierte Ausbildung einer definierten Blattspreite auf. Auch erschienen sie oft dicker und amorpher als die Blättchen der Kontrollpflanzen. Noch leitelementfreie Bildungen bestanden aus kleinen meristematisch-parenchymatischen Zellen.

Abb. 9

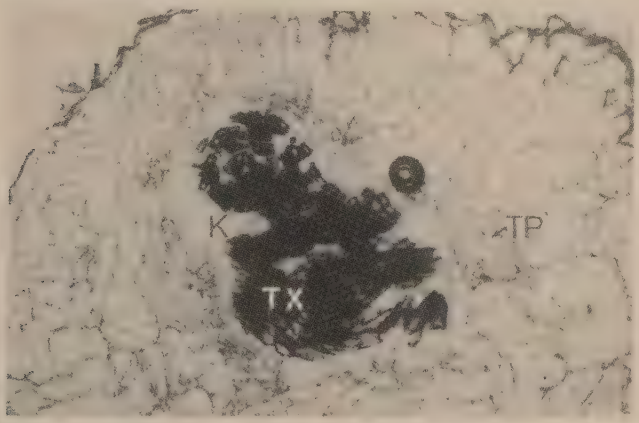



Abb. 10

Querschnitte durch den Tabakspro\u00df 11 Tage nach Infektion mit A. tumefaciens

Abb. 9: Stark vermehrtes Tumorphloem (TP) in einer vom Leitgewebe (L) ausgehenden Wucherung (Vergr. 1:14)

Abb. 10: Weiterentwicklung der Tumorinitialen von Abb. 3 (TX = Tumorxylem; K = Kambium; TP = Tumorphloem; Vergr. 1:28)

Das Tumorwachstum der mit Agrobacterium infizierten Pflanzen gestaltete sich weiterhin progressiv, während die Pflanzenentwicklung selbst rückläufig verlief. Oft verblieben nur noch einzelne Blätter auf einem kropfartig verdickten, bräunlichen Tumorsproß.
Schnitte durch derartige Neoplasien zeigten zunehmende Gewebeirregularitäten. Zahlreiche meristematische Zellkomplexe im Rindenparenchym des Sprosses und in der Peripherie des eigentlichen Tumors stellten ständige Erweiterungsstellen für Wucherungen dar. Dadurch kam es zu den typischen pustelartigen Auswüchsen der ziemlich amorphen Tumormassen. Vergleichbare Verhältnisse waren in Querschnitten durch die verdickten Blattstielbasen nachweisbar.

Die durch den Wundreiz an den Kontrollpflanzen hervorgetriebenen Blättchen entwickelten sich nach 21 Tagen nur noch langsam weiter. Die Wundheilung im Sproßgewebe war endgültig beendet. Die Kalluszellen waren zu Parenchymzellen und Wundtracheiden differenziert, wobei letztere oft eine neue Verbindung zwischen den auseinandergerissenen Xylemzellen des Leitbündelringes hergestellt hatten. Niemals war es zu einer Hervorwucherung von Zellen aus den Stichwunden gekommen.

An den mit TIF infizierten Pflanzen zeigte sich deutlich, daß viele der blattähnlichen Austriebe Vorläufer von Tumorwucherungen waren. Anstelle von Blättern mit normaler Morphologie entwickelten sich meist Gebilde mit verkrüppelten und verdrehten Stielen und mit verschmälerten, verdrillten und gekräuselten Blattspreiten. Diese Blattstiele konnten sich noch weiter verdicken und gingen dann kontinuierlich in eine nachfolgende, oft recht amorphe Zellwucherung über. Umgekehrt war auch zu beobachten, daß eine zunächst strukturlose Masse hervorwucherte, die dann ihrerseits deformierte Tumorblättchen differenzierte. Diese aus der TIF-Infektion resultierenden Strukturen waren als charakteristische Teratome zu bezeichnen. Sie waren anfänglich meist weißlich, später kräftig grün. Die Abbildung 11 zeigt einen Querschnitt durch einen kleinen Tumor, der aus einer Blattlücke in der Sproßbasis in der Nähe einer Infektionsstelle ausgewachsen

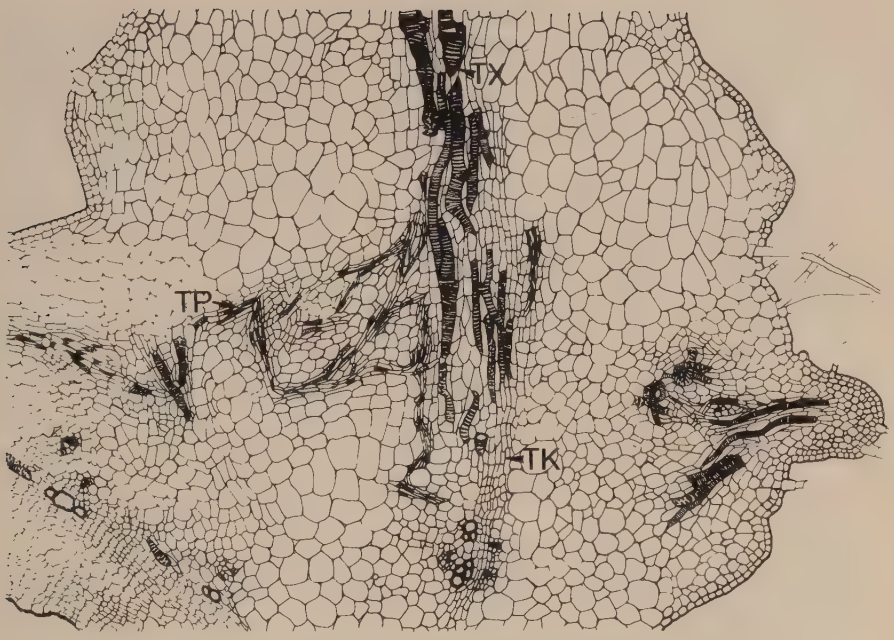



Abb. 11: Querschnitt durch einen kleinen Tumor am Tabakspro\u00df 21 Tage nach TIF-Infektion
(TK = Tumorkambium; TP = Tumorphloem; TX = Tumorxylem)

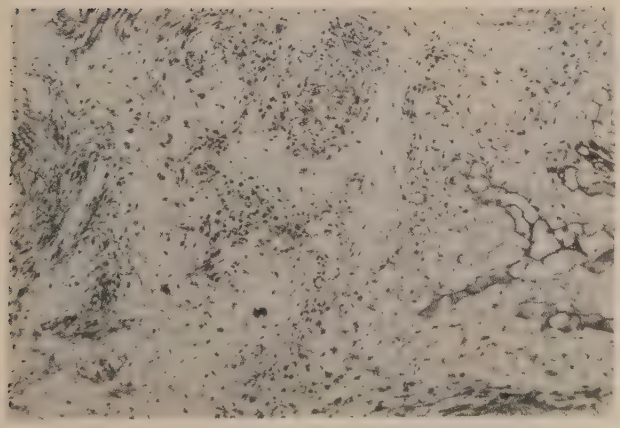


Abb. 12:
Querschnitt durch einen von Tumorgewebe durchsetzten Tabakspro\u00df 21 Tage nach Infektion mit A. tumefaciens
(Giemsa-Färbung)
(Vergr. 1:10)

war. Durch die Blattspur standen die Tracheiden des Tumors mit dem Xylem des normalen Sproßleitbündels in Verbindung. Zahlreiche kambiale Zellstreifen durchzogen die Wucherungen, vielfach mit eingelagerten Phloem- und Xylemzellen. Meist traten diese beiden Zelltypen jedoch als selbständige, das Gewebe durchziehende Phloem- und Xylembahnen auf. Zellkomplexe mit zentralem Phloem, umgeben von Xylem und umgekehrt, waren ebenfalls zu beobachten. Die Tumortracheiden konnten leicht an ihren Verstärkungsstrukturen erkannt werden, nicht dagegen die Tumorsiebzellen. Diese ließen sich jedoch zuweilen durch Kalloseanhäufungen lichtmikroskopisch mit Resorcinblau und fluoreszenzmikroskopisch mit Anilinblau nachweisen. Die Anhäufung von Kallose war in dem relativ jungen Gewebeverband bemerkenswert. Welche der beiden Zellarten -Phloem oder Xylem- zuerst in Tumor differenziert wurden, war nicht erkennbar.

In mit Agrobacterium infiziertem Sproß trieben fortlaufend narbige, unstrukturierte Geschwulste hervor, die erst hellgrün, dann weißlich und später braun wurden. Ältere Tumoren zeigten bereits Degenerationserscheinungen. Die braun verfärbten Neoplasien wiesen zunehmend eine rissige Oberflächenstruktur auf; sie konnten beträchtlich schrumpfen oder auch faulen.

In Sproß-Tumorquerschnitten war der Verlauf des normalen Leitgewebes meist nur noch andeutungsweise erkennbar. Tumorparenchym, -xylem und -phloem vermischten sich derartig mit normalen Zellen des Sproßgewebes, daß eine exakte Unterscheidung unmöglich wurde (Abb. 12). So wucherten häufig Tumorprotrusionen von der Rinde ins Mark vor und verdrängten diese Zellen weitgehend.

In diesem Stadium bestand fast das gesamte Rindenparenchym des Sprosses aus den typisch strukturierten Tumorinitialen und -knoten. In älteren Tumoren konnten diese Knoten durch Xylembrücken fusionieren.

Mit fortschreitendem Alter nahmen die Differenzierungsvorgänge im Tumor stark zu. Vor allem das Xylem breitete sich vom Tumorzentrum zur Peripherie hin aus. Derartige Verholzungen waren offenbar für die harte Konsistenz älterer Tumoren

verantwortlich. In einigen alten Neoplasien traten Hohlstellen im Lignifizierungsbereich auf.

Da die Wundheilungsprozesse der Kontrollpflanzen 5 Wochen nach Inokulation abgeschlossen waren, wurden keine Proben mehr genommen.

Die Tumorbildung an den mit TIF infizierten Nicotiana-Hybriden verlief dagegen progressiv. Trotz der teilweise sehr großen Tumormassen wurden die Pflanzen selten letal geschädigt. Meist entstanden typische grüne Teratome aus vielen kleinen deformierten Organen.

Die schematisierte Abbildung 13 soll anhand einer Schnittserie zusammenfassend Entstehung und Aufbau eines TIF-Teratoms verdeutlichen. Der Ursprung eines derartigen Tumors befand sich im Bereich einer Blattlücke oberhalb einer Nadelverletzungsstelle. Abzweigende Leitelemente des Zentralzylinders traten in den basalen Teil des Tumorgewebes über, während das Sproßrindenparenchym sich nahtlos in das Tumorparenchym fortsetzte. Der 1. Schnitt (A) lag in der Ebene, der 2. Schnitt (B) in der Peripherie der Stichwunde. Nekrotisierende Zellen waren von meristematischen Zellschichten umgeben. Einige der peripheren Wundzellen zeigten bereits Lignifizierung.

Im 3. Schnittniveau (C) war oberhalb des Einstichs die Unterbrechung des Zentralzylinders durch parenchymatische Zellen (sog. Blattlücke) erfolgt. Oberhalb der Nekrose in der 4. Schnittebene (D) schob sich die Zellwucherung über den Sproßrand nach außen. Gefäßstränge des Zentralzylinders verästelten sich im Tumorgewebe oder die tumorbürtigen Gefäßelemente hatten Anschluß an diejenigen des Sprosses gefunden (E und F). An dieser Stelle lag die engste Verbindung zwischen Sproß und Neoplasie. Rinden- und Tumorparenchym gingen kontinuierlich ineinander über. Oberhalb der Schnittebenen E/F hatte sich der Sproßleitzylinder wieder geschlossen. Ebenso ordneten sich die Leitelemente an der Basis der Wucherung zur unvollständigen Ringform. Jedoch war die normalerweise vorliegende Bikollateralität nur andeutungsweise vorhanden. Von diesem durchaus

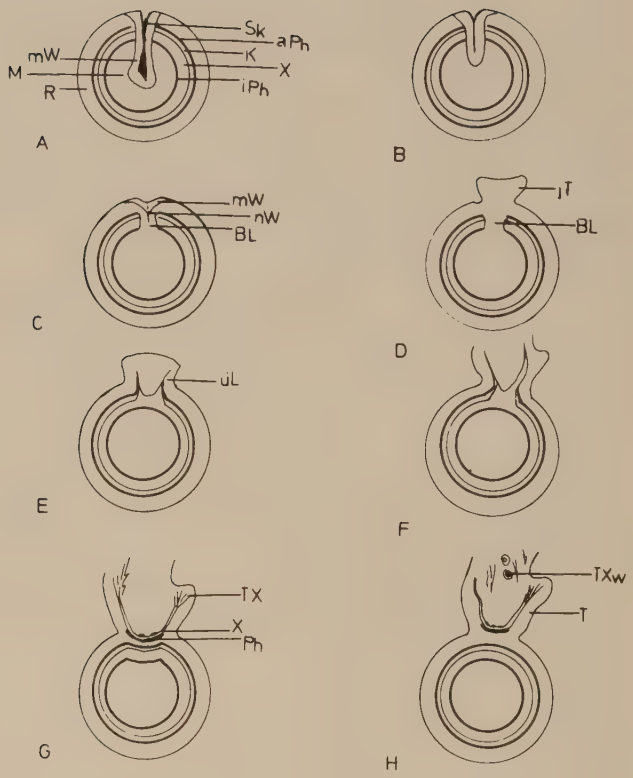



Abb. 13: Schnittserie durch die Austrittsstelle eines Sproßtumors an Nicotiana
(BL = Blattlücke; üL = übertretende Leitelemente; K = Kambium; M = Mark; ä/iPh = äußeres/inneres Phloem; R = Rinde; Sk = Stichkanal; T = Tumor; TX = Tumorxylem; TXw = Tumorxylem in Wirbelform; mW = merist. Wundzellen; nW = nekrot. Wundzellen; X = Xylem)

normal aussehenden Gefäßverlauf divergierten Leitelemente in die ganze Neoplasie, wobei deren Ausbreitung und Form zur Tumorperipherie hin zunehmend irregulär wurden (G und H). Ursprünglich sollte, vermutlich induziert durch den traumatischen Reiz, an dieser Stelle ein neues Blatt entstehen. Anzunehmen ist, daß die normale Determinationsfähigkeit des Gewebes durch die TIF-Infektion beeinflußt wurde und sich die Selbstbegrenzung des Kalluswachstums nicht mehr ergab. Die Tumoren wiesen niemals ein erkennbares Organisationsmuster auf. Wohl waren rudimentäre Fähigkeiten zur Differenzierung verblieben, wie die Bildung der Tumorblättchen zeigte. Derartige Organe entwickelten sich aus den meristematischen Zentren in der Tumorperipherie. Ausläufer der den Tumor durchziehenden Leitzellen zogen meist in diese organoiden Bildungen hinein und versorgten sie mit notwendigen Stoffen. Gleichzeitig erschienen damit die Leitelemente des Tumors wenigstens zum Teil funktionstüchtig (Abb. 14). Der Höhepunkt des Tumorwachstums war in diesem Stadium überschritten.

Das Tumorwachstum der mit Agrobacterium inokulierten Pflanzen wurde 5-6 Wochen nach Infektion allmählich beendet. Jede winzige Verletzung, die in irgendeiner Weise infiziert worden war, hatte Tumorwachstum zur Folge. Tumorstränge durchbrachen auch infizierte Blattstiele und drängten das normale Gewebe weit auseinander. Starke Degenerationserscheinungen machten sich zunehmend an den Sproßneoplasien bemerkbar. Entweder gingen gemeinsam mit den Tumoren auch die gesamten Wirtspflanzen ein oder aber diese überlebten die Wucherungen und konnten sich sogar wieder von der Infektion erholen. Die Möglichkeit zur Regeneration war offenbar daran gebunden, inwieweit das Tumorwachstum die Leitungsbahnen des Pflanzengewebes zerstört hatte. Wenige, leistungsfähige Leitelemente konnten die Pflanze retten.

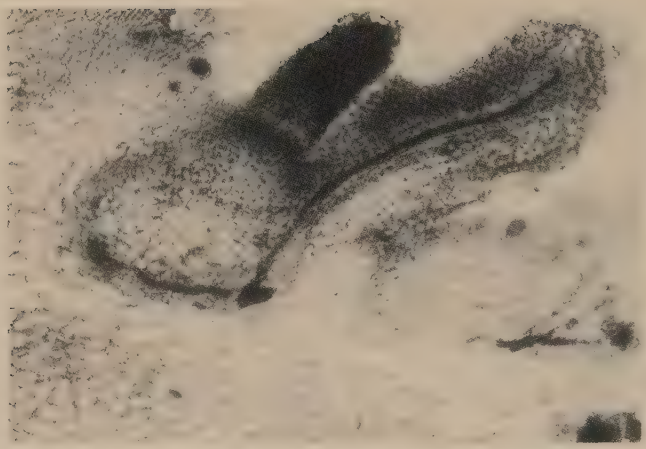


Abb. 14

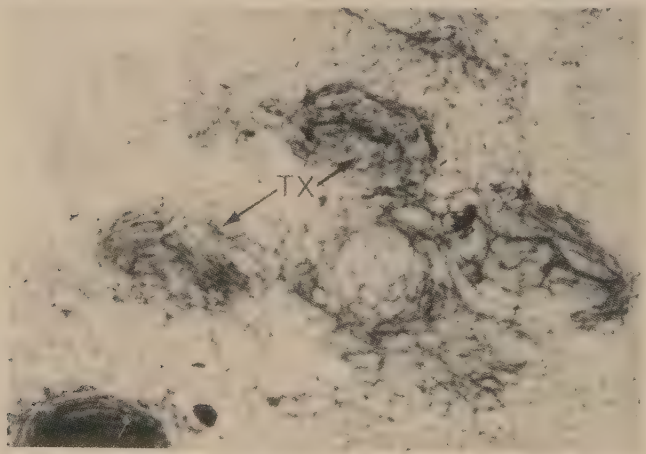


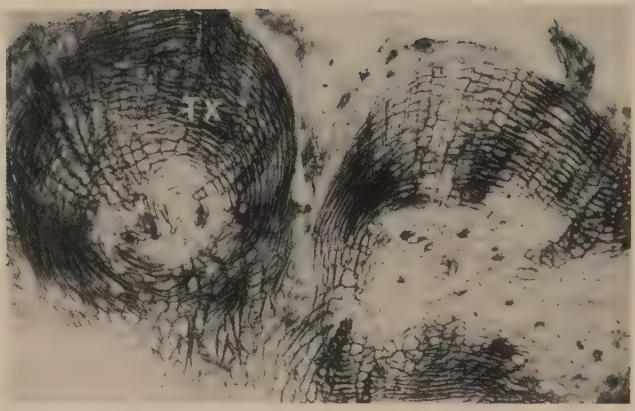

Abb. 15

Abb. 14: Querschnitt durch einen Tumor 40 Tage nach TIF-Infektion mit organoiden Bildungen aus der Tumorperipherie (Vergr. 1:30)

Abb. 15: Querschnitt durch einen Tumor 8 Wochen nach TIF-Infektion: wirbelförmige Anordnung von Tumortracheiden (TX)
(Färbung nach Brachet; Vergr. 1:32)

Die durch den TIF verursachten Teratome wuchsen nach 8 Wochen der Inokulation nur noch wenig weiter. Die Wirtspflanzen wurden insgesamt durch dieses Tumorwachstum deutlich weniger geschädigt als durch Agrobacterium-Tumoren. Mit fortschreitendem Alter nahm die Desorganisation des Tumorgewebes, besonders aber auch die Verholzung, ständig zu, was zu solchen Wirbeln führte, wie sie in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt sind.

Einen Überblick über die Gewebezusammensetzung in einem 8 Wochen alten Tumor gibt die Abbildung 17 wieder. Auffällig waren die unterschiedlichen Zellgrößen: kleinzellige Bereiche wechselten regellos mit größerzelligen ab. Meristematische Zentren in der Tumorperipherie, erkennbar an der geringen Zellgröße und den großen Nuclei, ließen die Teratome noch weiter wuchern. Das Tumorgewebe selbst drängte sich nie in das normale Sproßgewebe. Neoplastisches Wachstum war stets auf den außerhalb der Pflanze liegenden sichtbaren Tumor beschränkt und konnte klar vom Sproß abgetrennt werden. Auswüchse tumorbürtiger Blättchen erwiesen sich bei mikroskopischer Untersuchung stets als parenchymatische Zellwucherungen der peripheren Zellschichten. Wie die Abbildung 18 zeigt, entstanden die Auswüchse bevorzugt über Blattnerven. Häufig fanden sich nekrotische Zellen an den Spitzen der Protrusionen. Inwieweit diese Nekrosen Ursache oder Folgen dieser Wucherungen waren, blieb ungeklärt.
Da die Agrobacterium-Tumore zumeist in diesem Stadium abgestorben waren, mußte auf eine weitere Beschreibung verzichtet werden.




Querschnitt durch Tumoren 8 Wochen nach TIF-Infektion

Abb. 16: Tumortracheiden (TX) (Saffranin-Lichtgrün-Kristallviolett-Färbung; Vergr. 1:28)

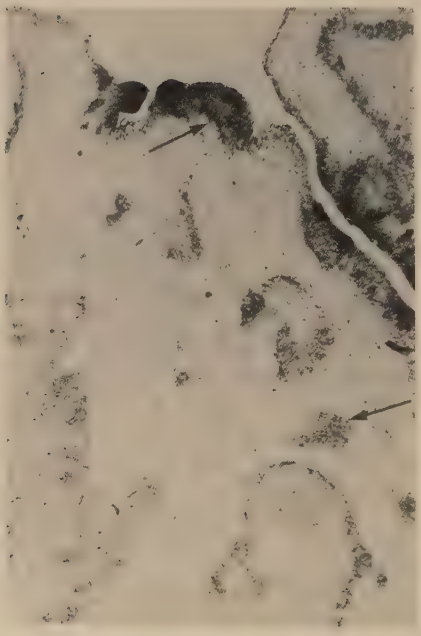


Abb. 17: Groß- und kleinzellige Gewebebereiche durchsetzt mit meristemat. Zel komplexen (Pfeil (Giemsa-Färbung Vergr. 1:10)

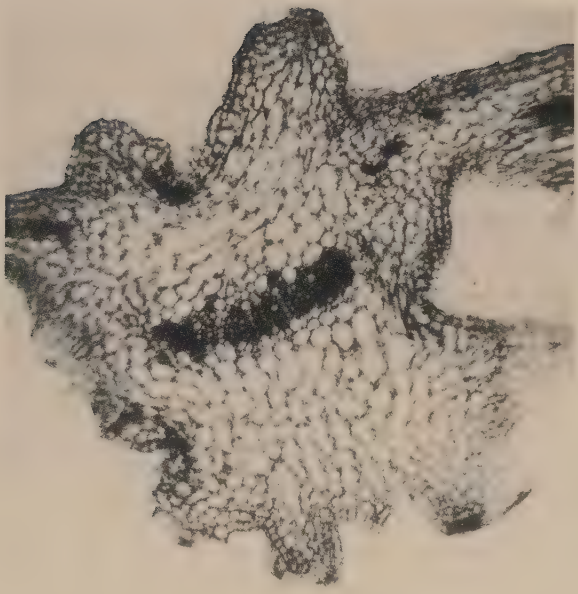


Abb. 18: Querschnitt durch ein Tumorblatt mit parenchymatischen Zellprogressionen ober- und unterhalb der Mittelrippe
(Vergr. 1:14)

### 3.1.1. Spontantumoren

An einer Aussaat von Nicotiana glutinosa x Nicotiana clevelandii trat an ca. 80% der Pflanzen im Pikierstadium ohne ersichtlichen Grund teratomartige Wucherungen an der Sproßbasis auf. Eine solche Pflanze ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Den histologischen Aufbau einer Sproßbasis mit spontanen Tumorwucherungen zeigt die schematisierte Zeichnung der Abbildung 20. Diese Neoplasien entstanden ebenfalls anstelle von normalen Blättern aus Blattanlagen. In Entstehungsort und Histologie war zwischen diesen Tumoren und den nach TIF-Inokulation hervorgerufenen Teratomen kein Unterschied festzustellen. Trotz Wucherungen konnten sich derartige Jungpflanzen mit normaler Blattbildung weiter entwickeln oder aber sie degenerierten. Andere bildeten eine einzige Tumormasse.

Spontantumoren können auf eine genetische Ätiologie hinweisen. Preßsaft aus Tumoren, die auf kreuzungsbedingte genetische Unverträglichkeiten zurückzuführen sind, erwies sich stets als nicht infektiös. Deshalb wurde Rohpreßsaft aus diesen spontan entstandenen Teratomen auf gesunde Nicotiana-Hybriden übertragen. Nahezu 100% der Testpflanzen reagierten mit krebsartigen Wucherungen. Um latente Infektiosität feststellen zu können, wurde aus Sproßgeweben der gesund erscheinenden Jungpflanzen derselben Aussaat ebenfalls Preßsaft hergestellt und Hybriden damit inokuliert. In keinem Fall trat Tumorbildung auf. Ebenso negativ verlief die Inokulation von Datura stramonium sowohl mit dem Tumor- als auch mit dem Kontrollinokulum. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um eine möglicherweise vorhandene Infektion mit Agrobacterium tumefaciens zu erkennen. Datura stramonium reagierte stets eindeutig positiv auf eine Agrobacterium-Infektion und negativ auf die Inokulation mit dem TIF.

Die entstandenen Tumoren wurden ein weiteres und ein 3. Mal auf gesunde Hybriden übertragen. Jedesmal lag die Tumorrate bei 90-100%. Die parallel durchgeführten Inokulationen an Datura stramonium blieben dagegen immer symptomlos.

Abb. 19: Spontantumor an junger Tabakhybride

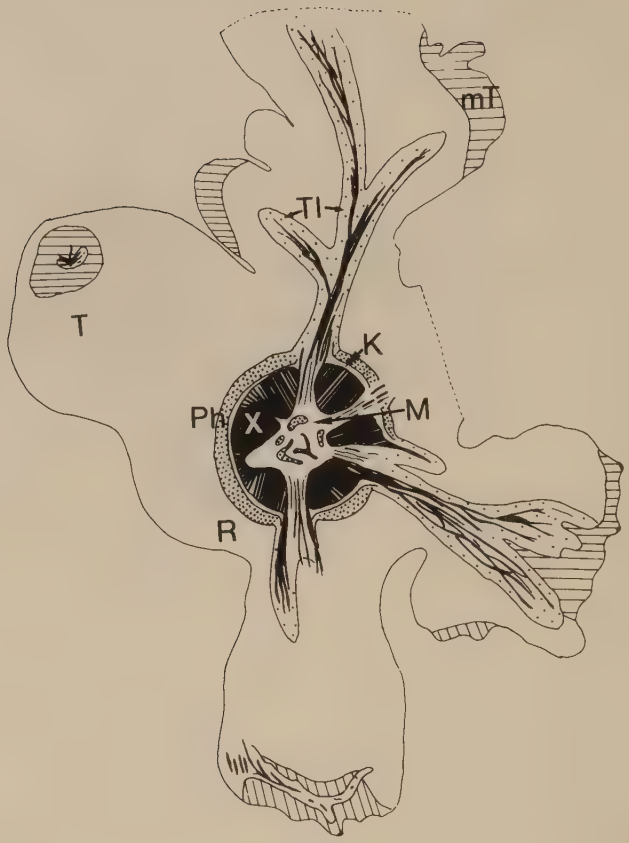



Abb. 20: Querschnitt durch die Sproßbasis einer jungen Tabakhybride mit zahlreichen spontanen Tumorwucherungen (K = Kambium; M = Mark; Ph = Phloem; R = Rinde; Tl = Tumorleitzellen; T = Tumorparenchym; mT = merist. Tumorzellen; X = Xylem)

Hieraus ist ersichtlich, daß bereits Keimlingsstadien (vermutlich vom Samen her) latent mit dem übertragbaren tumorinduzierenden Faktor verseucht sein können.

## 3.2. Wundheilung und Tumorkonditionierungsphase

Tumoren lassen sich nur dann durch den TIF in Tabakpflanzen induzieren, wenn zur Infektion eine Verwundung hinzukommt. Verwundung, Wundheilung und Tumortransformation sind korreliert.
In dem folgenden Versuch wurde deshalb geprüft, wann während des Wundheilungsprozesses die höchste Empfindlichkeit der Zellen für eine Tumorinduktion vorliegt. Die Zeitspanne zwischen Verwundung und dem Erreichen dieser optimalen Empfindlichkeit wird Konditionierungsphase (BEIDERBECK, 1977) genannt. Junge Nicotiana-Pflanzen wurden mit sterilem Puffer verwundet und nach 1, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden mit jeweils 0,5 ml Tumor-Rohpreßsaft (auf 1 g Frischgewicht kam 1 ml Puffer) pro Pflanze an den Wundstellen beträufelt, ohne neue Wunden zu setzen. Der Preßsaft war zu Versuchsbeginn hergestellt und portionsweise eingefroren worden. Die unverminderte Infektiosität des tiefgekühlten Inokulums wurde durch parallele Inokulationen an nicht vorher verletzten Kontrollpflanzen sichergestellt. In 2 Wiederholungen standen jeweils 70 Pflanzen zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Eine 6-12stündige Wundheilungsphase vor Infektion führte zu einer sehr frühen Tumorbildung und zur höchsten Tumorrate. Pflanzen mit nur 1stündiger oder keiner Heilungszeit vor Infektion zeigten die üblichen Charakteristika: erstes sichtbares Tumorwachstum nach mindestens 14 Tagen Inkubation und eine Tumorrate um 90%. Demgegenüber fiel bei Pflanzen mit 24-72stündiger Wundheilung vor TIF-Infektion die Kapazität für eine Transformierbarkeit deutlich ab.

Tabelle 1

Tumorwachstum an Nicotiana-Hybriden bei zeitlich verzögerter TIF-Infektion nach Verwundung

| | Anzahl der Pflanzen mit Tumoren von je 10 Versuchspflanzen Tage nach Versuchsbeginn | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 8 | | | | 14 | | | | 21 | | | | 32 | | | |
| Versuchsnummer | 1 | 2 | 3 | Σ | 1 | 2 | 3 | Σ | 1 | 2 | 3 | Σ | 1 | 2 | 3 | Σ |
| Wundheilungszeit vor Infektion (Std.) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 5 | 12 | 8 | 6 | 7 | 21 | 8 | 9 | 9 | 26 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 10 | 9 | 8 | 9 | 26 | 10 | 8 | 9 | 27 |
| 6 | 0 | 2 | 2 | 4 | 5 | 6 | 6 | 17 | 9 | 9 | 9 | 27 | 10 | 10 | 10 | 30 |
| 12 | 2 | 1 | 3 | 6 | 7 | 7 | 7 | 21 | 9 | 9 | 9 | 27 | 10 | 10 | 10 | 30 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 11 | 4 | 4 | 4 | 16 | 6 | 6 | 7 | 19 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 10 | 5 | 6 | 7 | 18 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 |

In Querschnitten durch verwundete Pflanzen war zu beobachten, daß die ersten Zellteilungen im Wundbereich ca. 24 Stunden nach Verletzung begannen. Daraus folgt für die Ergebnisse, daß die empfindlichste transformierbare Phase der Zelle vor oder zu Beginn des Teilungsprozesses liegen mußte. Nicht alle vom Wundreiz betroffenen Zellen reagierten jedoch gleichzeitig mit Mitosen. Somit blieben auch noch 48 Stunden nach Verwundung Zellen für den TIF transformierbar. In wenigen Fällen gelang die Transformation sogar noch nach 72stündiger Wundheilung. Bei noch länger andauernden Heilungsprozessen hörte die Sensitivität der betroffenen Zellen für eine Umstimmung gänzlich auf.
Demnach liegt die Konditionierungsphase für die Transformation der Nicotiana-Hybriden durch den TIF zwischen 0 und 12 Stunden nach Verwundung.

Nach 32 Tagen wurden die Tumoren abgeerntet und deren Frischgewicht bestimmt. Tumorgröße und -gewicht konnten eindeutig mit der Länge der Wundheilungsphase vor der Infektion korreliert werden.
Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, waren die Tumorgewichte der ersten 4 Versuchsreihen nicht wesentlich verschieden. Einen leichten Anstieg zeigten die Durchschnittsgewichte der Pflanzen mit 6- und 12stündiger Wundregeneration, wohingegen die Tumorgewichte von Pflanzen mit 24- und 48stündigem Heilungsprozess wesentlich tiefer lagen. Winzige Knötchen und verkrüppelte Tumorblättchen ergaben bei Pflanzen mit 72stündiger Wundheilung die besonders niedrigen Gewichtswerte.

Tabelle 2

Tumorfrischgewicht nach unterschiedlich langer Wundheilungszeit vor TIF-Infektion (ca. 5 Wochen nach Versuchsbeginn)

| Wundheilungszeit vor Infektion (Std.) | Gewicht pro Tumor (g) |
|---|---|
| 0 | 4,20 * |
| 1 | 4,23 |
| 6 | 4,45 |
| 12 | 4,51 |
| 24 | 2,41 |
| 48 | 2,28 |
| 72 | 0,98 |

* Mittelwerte aus 3 Versuchen

## 3.3. Exogene Applikation von Wachstumsregulatoren

In der normal sich entwickelnden Pflanze ist ein ausgewogenes Verhältnis der Wachstumsregulatoren vorauszusetzen. Bei Tumorwachstum wird dieses ausbalancierte System in einer noch nicht bekannten Weise gestört.
In den folgenden Versuchen sollte die Wirkung verschiedener Phytohormone auf die Tabakpflanzen getestet und eine mögliche hormonelle Beeinflussung des Tumorwachstums untersucht werden. Verwendet wurden wachstumsfördernde Phytohormone aus den drei Hauptgruppen der Indolderivate, Gibberelline und Cytokinine.

### 3.3.1. Einfluß von unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen auf das Pflanzenwachstum

Zunächst war eine für die Testpflanzen annähernd optimale Applikationsmenge von Phytohormonen zu ermitteln. Die Konzentration durfte einerseits die Pflanzen nicht schädigen, sollte andererseits aber deutliche Auswirkungen zeigen. Als Versuchspflanzen dienten junge Nicotiana-Hybriden. Von Naphtylessigsäure, Indolessigsäure, Gibberellinsäure und Kinetin wurden 0,05, 0,1, 0,5, 1 und 2%ige Lanolinpasten hergestellt und gemäß der angegebenen Methode appliziert. Dabei entsprach eine Pastenmenge von 0,02 g einem Hormongehalt:

| bei | 0,05% | 0,1% | 0,5% | 1% | 2% |
|---|---|---|---|---|---|
| von | 10 µg | 20 µg | 100 µg | 200 µg | 400 µg |

Bereits innerhalb des 1. Tages nach Naphtylessigsäure (NAA)-Behandlung waren deutliche Hormonwirkungen zu erkennen. Die Blattstiele, besonders der unterhalb der Auftragungsstelle gelegenen Blätter, zeigten Wuchssteigerungen auf der lichtzugewandten Oberseite. Dadurch krümmten sich die Stiele mehr oder weniger stark nach unten. Bei den hohen Konzentrationen von 1 und 2% erfolgte eine Verdrehung der Blattstiele. Sie verfärbten sich auf der stärker wachsenden Seite weißlich und die Zellen hypertrophierten. In diesen Hypertrophien konnten Hohlräume entstehen, wodurch das Gewebe leicht kollabierte. Histologisch glich dieses Gewebe lockerem Kallus. NAA entfaltete folglich seine Wirkung bevorzugt auf der lichtzugewandten Seite. Zusätzlich wurden die meisten Blattstiele spöde und brachen leicht, vermutlich infolge von Assimilationsstau. Die Blattspreiten der unter Hormoneinwirkung stehenden Blätter verkrüppelten statt weiterzuwachsen. Die 1 und 2%igen NAA-Pasten führten zu einer Zunahme des Sproßdurchmessers mit gleichzeitiger starker Wachstumshemmung. Bei allen Konzentrationen war eine deutliche Hemmung des Seitenknospenaustriebs zu beobachten.
Die Abbildung 21 zeigt die Auswirkungen von 0,5%iger NAA-Paste auf Nicotiana im Vergleich zur unbehandelten Pflanze.

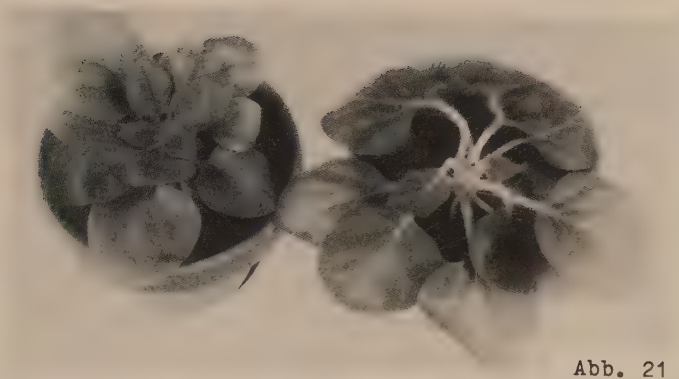


Abb. 21

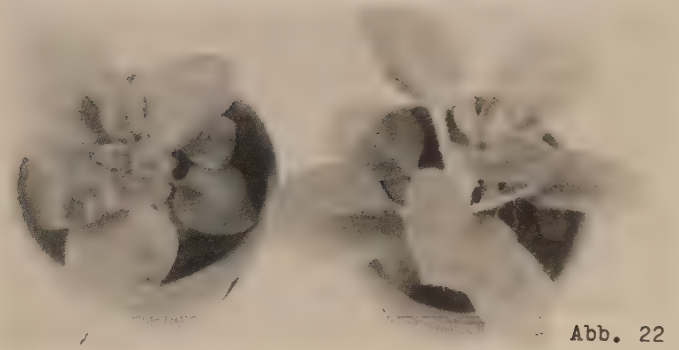


Abb. 22

Abb. 23

Nicotiana-Hybriden; links: jeweils die unbehandelte Pflanze; rechts: mit 0,5%iger NAA- (Abb. 21), 0,5%iger Gibberellinsäure (Abb. 22) und 0,5%iger Kinetin-Lanolinpaste (Abb. 23) behandelte Pflanzen

Die 0,05 bis 2%ige Pastenkonzentrationen von Indolessigsäure riefen die gleichen morphologischen Veränderungen wie NAA hervor. Deshalb wurde im Weiteren wegen der größeren Stabilität von NAA nur noch mit diesem Phytohormon gearbeitet.

0,05 bis 2%ige Gibberellinsäurepasten bewirkten konzentrationsabhängiges Streckungswachstum von Sproß und Blattstielen. Die Blätter, die nach Behandlung neu austrieben, hatten verschmälerte und verlängerte Blattspreiten. Bei Hormonkonzentrationen von 2 und 1% rollten sich die Spreiten an den Rändern nach oben ein. Alle Neuaustriebe waren hellgelbgrün gefärbt. Die Abbildung 22 zeigt eine mit 0,5%iger Gibberellinsäure-Paste behandelte Nicotiana-Pflanze und deren unbehandelte Kontrolle. Die Behandlung mit Gibberellinsäure führte bei den Nicotiana-Hybriden, die unter Kurztagsbedingungen Rosettenform entwickeln, zum Streckenwachstum und damit zur Aufhebung des Kurztagseffekts.

Behandlungen mit den unterschiedlich konzentrierten Kinetinpasten ergaben als auffälligste Wirkung die Förderung des Seitenknospenaustriebes. Außerdem vergrößerten sich die Blattspreiten, wobei die Grünfärbung intensiver wurde. Insgesamt trat nur ein geringes Sproßwachstum auf. Die Symptomausprägung erfolgte erst nach ca. 4 Tagen und war nicht so streng mit der Hormonkonzentration korreliert wie bei den beiden anderen Wuchsstoffen.
In der Abbildung 23 ist die Kinetinwirkung an Nicotiana im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

Alle hormonbedingten Symptome verloren mit fortlaufender Versuchsdauer an Ausprägung. Neuaustriebe zeigten nach 5 bis 6 Wochen wieder normale Entwicklung.

Zusammenfassend lassen sich die Auswirkungen der 3 Phytohormone auf die Testpflanzen folgendermaßen charakterisieren:

NAA: Zellvergrößerung, Wachstumsförderung bei niedrigen Konzentrationen, Wachstumshemmung bei hohen Konzentrationen, Tropismen, Unterdrückung des Seitenknospenaustriebs.

Gibberellinsäure: Zellstreckung, Längenwachstum des Kormus, Aufhellung der Grünfärbung.

Kinetin: Zellteilung, Seitenknospenaustrieb, Blattspreitenvergrößerung, Intensivierung der Grünfärbung.

In gleicher Weise wurden auch Kombinationspräparate getestet. Im allgemeinen addierten sich entsprechend der Kombination die Symptome, jedoch konnte sich ein Anteil auch stärker ausprägen.

NAA-Gibberellinsäure: Streckung und Erstarkung der ganzen Pflanze, wobei die NAA-Wirkung oft etwas zurückgedrängt war. Beide Hormone wirkten sich konzentrationsabhängig aus.

Kinetin-NAA: Kinetin mit seiner erst spät sichtbar werdenden Wirkung vermochte die rasch durch NAA induzierten Veränderungen an den Pflanzen kaum zu beeinflussen. Epinastie, Hypertrophie und Krüppelwachstum (NAA) verdrängten besonders bei höheren Konzentrationen den Kinetineinfluß.

Kinetin-Gibberellinsäure: Streckung des Pflanzenkormus mit deutlicher Förderung des Seitenknospenaustriebs. Die Aufhellung durch Gibberellinsäure war etwas abgeschwächt. Das Ausmaß des Streckungswachstums hing allein von der Gibberellinsäurekonzentration ab.

NAA-Gibberellinsäure-Kinetin: Epinastie und Hypertrophie (NAA) waren ebenso gemindert wie Streckungswachstum (Gibb.) und die Förderung des Seitenknospenaustriebs (Kinetin). Alle Wuchsstoffe zeigten zwar deutliche, jedoch abgeschwächte Merkmale.

Bei Konzentrationen von 0,5% lagen deutliche morphologische Veränderungen ohne ersichtliche Gesamtschädigung der Pflanzen

vor. Deshalb wurde, falls nicht anders angegeben, diese Konzentration als Standard für alle weiteren Versuche genommen.

### 3.3.2. Auswirkungen von Wachstumsregulatoren auf das Tumorwachstum

#### 3.3.2.1. Wuchsstoffapplikation 24 Stunden vor Infektion

Junge Nicotiana-Hybriden wurden mit 0,5%igen Wuchsstoff-Lanolin-Pasten (Einzel- und Kombinationspräparate) behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte teils eine sterile Verwundung, teils die Infektion mit dem TIF. Als Kontrolle dienten infizierte Pflanzen ohne Hormonapplikation .
10 Pflanzen standen pro Versuchsglied zur Verfügung. Der Versuch wurde einmal wiederholt.

7 Tage nach TIF-Infektion zeigten sich an einigen der mit Kinetin-Paste behandelten Pflanzen winzige Zellknötchen an der Sproßbasis und in den Blattachseln. Durch ihre rundliche, kompaktere Form unterschieden sich diese Knötchen von den normalen Blattinitialen. An allen anderen Versuchspflanzen traten noch keine solcher Proliferationen auf.

Die Tumorinitialen der mit Kinetin behandelten Tabakpflanzen hatten sich 12 Tage nach Versuchsbeginn zu echten Neoplasien entwickelt. Dagegen war an den anderen infizierten Pflanzen weiterhin keinerlei Tumorwachstum zu erkennen. Die Wiederholung des Versuchs sicherte das Ergebnis, daß Kinetin im Einzelpräparat das zeitliche Auftreten sichtbarer Tumoren förderte. Kinetin in Verbindung mit NAA und Gibberellinsäure hatte keinen erkennbaren positiven Einfluß, ebensowenig konnte Kinetin in der Dreierkombination die Tumorentwicklung vorverlegen.

19 Tage nach Versuchsbeginn hatten von jeweils 10 Testpflanzen sowohl die unbehandelten, infizierten Kontrollpflanzen als auch die mit Wachstumsregulatoren behandelten Pflanzen an mindestens 8 Pflanzen Tumoren entwickelt. Nur nach NAA-Gibberellinsäure und NAA-Kinetin-Gibberellinsäure-Behandlung

lag die Anzahl der Tumor-tragenden Hybriden noch deutlich niedriger (Tabelle 3).
Obwohl die Tumoren zu diesem Zeitpunkt zum Teil noch recht klein waren, konnten Phytohormonwirkungen auf die Tumormorphologien bereits erkannt werden. Die kleinen Neoplasien der Kontrollpflanzen zeigten ebenso wie die mit NAA behandelten Pflanzen Teratomstruktur. Dagegen hatten die Kinetin-Pflanzen mehr Tumormasse gebildet. Außerdem war die Struktur dieser Tumoren deutlich amorpher als die aller anderen Neoplasien. Demgegenüber entwickelten sich nach Gibberellin-Applikation sehr viel kleinere Wucherungen, die meist nur aus winzigen hellgrünen Knötchen mit typisch langgestreckten Blättchen bestanden. Die Tumoren der mit Hormonkombinationen behandelten Pflanzen glichen alle weitgehend denjenigen der Kontrollen. Lediglich nach NAA-Gibberellinsäure-Applikation entwickelten die Pflanzen wiederum sehr kleine Tumoren.

Tabelle 3

Tumorwachstum an infizierten und hormonbehandelten Nicotiana-Hybriden 19 Tage nach Versuchsbeginn

| Hormonbehandlung | Anzahl der Pflanzen mit Tumorentwicklungen von jeweils 10 infizierten Pflanzen | |
|---|---|---|
| | 1. Versuchsreihe | 2. Versuchsreihe |
| Kontrolle | 10 | 9 |
| NAA | 9 | 9 |
| Gibberellinsäure | 9 | 8 |
| Kinetin | 10 | 10 |
| NAA-Kinetin | 10 | 9 |
| NAA-Gibb. | 5 | 5 |
| Kinetin-Gibb. | 8 | 8 |
| NAA-Kinetin-Gibb. | 5 | 6 |

4 Wochen nach Versuchsbeginn ließen die Phytohormonwirkungen allmählich nach. Diese lange Wirkungsdauer bewies, daß die Hormon-Lanolin-Pasten einen guten Wirkstoffspeicher darstellten.
In der Tumorausbildung ergaben sich eindeutige morphologische Unterschiede in Abhängigkeit von den applizierten Wuchsstoffen. Kinetin führte stets zu amorphen grünen Tumoren ohne organoide Bildungen, während Gibberellinsäure in allen Fällen die Tumormasse stark reduzierte und die Tumorblättchen zu Streckungswachstum veranlaßte.
Alle anderen Applikationen ergaben im wesentlichen die gleichen Teratomstrukturen wie die der unbehandelten Kontrollpflanzen.
Da nach diesem Behandlungszeitraum in allen Versuchsgliedern mindestens 80% der Pflanzen Wucherungen aufwiesen, konnten die Wachstumsregulatoren keinen signifikanten Einfluß auf die Tumorinduktion ausgeübt haben.
Nach 5 Wochen wurden die Tumoren abgeerntet, deren Frischgewicht bestimmt und mit den Tumoren der Kontrollpflanzen verglichen (Tabelle 4). Danach war ein deutlicher Massenzuwachs der Neoplasien nur nach Kinetin und NAA-Kinetin-Applikation nachzuweisen. Nach Gibberellin- und NAA-Gibberellin-Behandlung trat dagegen eine Gewichtsreduktion auf. Die Phytohormone wirkten demnach nur auf die Tumorform und -masse, nicht dagegen auf Infektiosität des TIF und auf Tumorinduktion.

Tabelle 4

Tumorgewicht von hormonbehandelten und unbehandelten Nicotiana-Hybriden

| Hormonbehandlung | Tumorfrischgewicht pro Pflanze (g) | % Gewichtsdifferenz bezogen auf Kontrolle |
|---|---|---|
| Kontrolle | 2,56* | - |
| NAA | 2,77 | + 8,2 |
| Gibberellinsäure | 1,25 | - 51,2 |
| Kinetin | 3,40 | + 32,8 |
| NAA-Kinetin | 3,50 | + 36,7 |
| NAA-Gibb. | 1,12 | - 56,7 |
| Kin.-Gibb. | 2,70 | + 5,4 |
| NAA-Kin.-Gibb. | 2,33 | - 9,1 |

*Mittelwerte von 2 Versuchen

Der folgende Versuch unterstützt diese Vermutung.
Tumoren von hormonbehandelten Pflanzen wurden nach Phytohormontyp getrennt und gleiche Frischgewichtsmengen zu Rohpreßsaft verarbeitet. Als Kontrolle diente das Inokulum aus den Tumoren der Kontrollen. Auf je 10 Testpflanzen kamen gleiche Volumina gleichkonzentrierten Inokulums. Der Versuch wurde einmal wiederholt.
Die resultierenden Tumoren zeigten mehr oder weniger an allen Pflanzen die typische Teratomstruktur. Hormonabhängige morphologische Unterschiede sowie vorzeitige Tumorentwicklungen waren nicht mehr vorhanden. Die Tumorausbeute nach 5 wöchiger Versuchsdauer lag zwischen 80 und 90%, Tumorgröße und -gewicht variierten in allen Versuchsgliedern in gleicher Weise.

3.3.2.2. Phytohormonapplikation 6 Tage vor und nach Infektion

Jeweils 10 Nicotiana-Hybriden wurden entweder 6 Tage vor oder 6 Tage nach TIF-Infektion mit 0,5%igen NAA-, Kinetin- und Gibberellinsäure-Lanolin-Pasten behandelt. Zum Vergleich dienten Pflanzen, die gleichzeitig infiziert und hormonbehandelt wurden, und als Kontrollen infizierte Pflanzen ohne Applikation von Wachstumsregulatoren. Der Versuch konnte zweimal wiederholt werden.

6 Tage nach Versuchsbeginn waren bei den nur infizierten Tabakpflanzen, ebenso wie bei den anderen Versuchspflanzen, noch keine Tumorsymptome festzustellen.
Die nur mit NAA, Kinetin und Gibberellinsäure behandelten Pflanzen zeigten die typischen hormonbedingten morphologischen Merkmale. An den gleichzeitig infizierten und mit Phytohormonen behandelten Pflanzen waren dagegen folgende Besonderheiten zu beobachten: Die Wirkungen der beiden Wachstumsregulatoren NAA und Gibberellinsäure konnten sich nur in abgeschwächtem Maße entfalten. Diese Minderung könnte möglicherweise durch die Inokulationstechnik bedingt sein. Die Nadelstiche beschädigten oder zerstörten vielfach die Vegetationspunkte und Blattknospen, sodaß das applizierte Auxin dann vermutlich nur das natürliche ersetzte. Inwieweit die verminderte Gibberellinwirkung auch den Verletzungen zuzuschreiben war, blieb ungeklärt, da dieses Hormon bevorzugt in der Wurzel synthetisiert wird.

Die Tumorausbeute 20 und 30 Tage nach Versuchsbeginn aus 3 Versuchen ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Dabei muß unterschieden werden, ob die Pflanzen erst 14 bzw. 24 Tage (TIF-Infektion 6 Tage nach Hormonabgabe) oder bereits 20 bzw. 30 Tage (TIF-Infektion vor Behandlung) infiziert waren. Deshalb waren auch zu beiden Versuchsgliedern gesonderte Kontrollen notwendig.

Tabelle 5

Tumorwachstum an Nicotiana-Hybriden 14 bzw. 20 Tage (I) und 24 bzw. 30 Tage (II) nach TIF-Infektion und Phytohormonapplikation

| | Behandlung mit Wachstumsregulatoren I | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 6 Tage vor TIF-Infekt. | | | | gleichzeitig mit TIF-Infekt. | | | | 6 Tage nach TIF-Infekt. | | | |
| Versuchsnummer | 1 | 2 | 3 | Σ | 1 | 2 | 3 | Σ | 1 | 2 | 3 | Σ |
| Wachstumsregulatoren: | | | | | | | | | | | | |
| NAA | 1* | 0 | 1 | 2 | 6 | 5 | 5 | 16 | 8 | 8 | 7 | 23 |
| Kinetin | 2 | 2 | 3 | 7 | 10 | 8 | 9 | 27 | 8 | 5 | 8 | 21 |
| Gibberellins. | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 5 | 6 | 5 | 6 | 17 |
| $Ko_1^+$ | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| $Ko_2$ | - | - | - | - | 6 | 6 | 7 | 19 | 6 | 6 | 7 | 19 |

| | Behandlung mit Wachstumsregulatoren II | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 6 Tage vor TIF-Infekt. | | | | gleichzeitig mit TIF-Infekt. | | | | 6 Tage nach TIF-Infekt. | | | |
| Versuchsnummer | 1 | 2 | 3 | Σ | 1 | 2 | 3 | Σ | 1 | 2 | 3 | Σ |
| Wachstumsregulatoren: | | | | | | | | | | | | |
| NAA | 2 | 3 | 3 | 8 | 6 | 6 | 5 | 17 | 10 | 10 | 9 | 29 |
| Kinetin | 6 | 5 | 6 | 17 | 10 | 10 | 9 | 29 | 8 | 7 | 9 | 24 |
| Gibberellins. | 0 | 1 | 0 | 1 | 5 | 5 | 4 | 14 | 8 | 7 | 8 | 23 |
| $Ko_1^+$ | 6 | 6 | 7 | 19 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| $Ko_2$ | - | - | - | - | 9 | 10 | 9 | 28 | 9 | 10 | 9 | 28 |

* Anzahl Pflanzen mit Tumoren von jeweils 10 Versuchspflanzen

$Ko_1^+$: Kontrolle zur Versuchsserie mit 14 bzw. 20 Tage andauernden Infektion

$Ko_2$ : Kontrolle zur Versuchsserie mit 20 bzw. 30 Tage andauernden Infektion

NAA-Applikation gleichzeitig mit TIF-Infektion hatte nach 20tägiger Versuchsdauer zu einer Tumorentwicklung an ca. 50% der Pflanzen geführt, wohingegen bei der um 6 Tage verzögerten Hormongabe ca. 80% der Pflanzen Wucherungen zeigten. Im Gegensatz zu den Kontrollen ($Ko_1$) waren bereits an wenigen der mit NAA vorbehandelten Pflanzen nach 14 Tagen kleine Neoplasien zu erkennen. Die äußerlich sichtbaren NAA-Auswirkungen waren an den Pflanzen mit Vorbehandlung am stärksten, deutlich schwächer bei gleichzeitiger Applikation und Infektion und am geringsten bei Nachbehandlung. Vermutlich wurden die applizierten Hormon-Wirkstoffe in größerem Umfange in der Tumorentwicklung verbraucht.

Die Kinetinapplikation mit gleichzeitiger Infektion ergab, ebenso wie die Hormon-Nachbehandlung, eine sehr hohe Anzahl tumorbildender Pflanzen. Die erst 14 Tage währende Infektion (Vorbehandlung mit Kinetin) hatte bereits an 20-30% der Pflanzen zu Wucherungen geführt. Kinetin beschleunigte in allen Versuchen die zeitliche Tumorentwicklung. Die morphologischen Wirkungen waren bis auf den gesteigerten Knospenaustrieb nach Kinetin-Vorbehandlung verhältnismäßig unauffällig.

Die Tumorwucherungen der mit Gibberellinsäure behandelten Pflanzen entwickelten sich in direkter Korrelation zu den morphologischen Veränderungen am Pflanzenkormus. Die Vorbehandlung mit dem Phytohormon hatte das stärkste Streckungswachstum zur Folge. Neoplastisches Wachstum war noch nicht zu beobachten. Die gleichzeitige Hormon- und TIF-Gabe führte zu abgeschwächter Gibberellin-Wirkung und zu relativ wenigen Tumoren. Dagegen erreichte die Anzahl der Pflanzen mit Tumoren bei Hormon-Nachbehandlung den Wert der Kontrollen ($Ko_2$). In Übereinstimmung dazu zeigten die Pflanzen in diesem Versuchsglied auch die geringsten morpholgischen Veränderungen.

Die Ergebnisse 30 Tage nach Versuchsbeginn sind aus derselben Tabelle ersichtlich. NAA schien ebenso wie Gibberellinsäure bei vor- und gleichzeitiger Behandlung eine Hemmwirkung

auf die Tumorentwicklung auszuüben, während Kinetin fördernd wirkte.

Im weiteren Versuchsverlauf zeigte sich, daß die beobachteten Hemmungen oder Förderungen der Tumoraustriebe durch Einwirkungen der Wachstumsregulatoren auf den pflanzlichen Stoffwechsel bedingt wurden. Die Wirkstoffe konnten jedoch die Infektiosität des TIF nicht beeinflussen. Alle infizierten Pflanzen wiesen trotz unterschiedlicher Behandlungen nach 8 wöchiger Versuchsdauer einen sehr hohen Infektionserfolg auf: über 90% der Versuchspflanzen zeigten tumorartige Auswüchse. Unterschiede gab es nur noch in Struktur und Größe der Tumoren, gemäß der in Versuch 3.3.2.1. beschriebenen Beobachtungen. Je mehr die Phytohormone die Morphologie der Pflanzen veränderten, desto geringer blieb die Größe der entstehenden Tumoren. Andererseits konnten die Wuchsstoffe, wenn sie 6 Tage nach der TIF-Infektion gegeben wurden, ihre Wirkung in den Pflanzen selbst nur noch sehr abgeschwächt entfalten.

### 3.3.3. Wirkung von Wachstumsregulatoren auf eine Infektionsrate mit 50% Tumorwachstum

In den vorangegangenen Versuchen hatte sich herausgestellt, daß die verwendeten Phytohormone zwar keinen Einfluß auf die Transformationsrate, wohl aber auf die Größe und Struktur der Tumoren hatten. In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob Wachstumsregulatoren die Tumorentwicklung bei niedriger TIF-Konzentration positiv beeinflussen konnten. Dazu war in Vorversuchen das Tumorinokulum soweit zu verdünnen, bis damit nur noch an ungefähr 50% der Versuchspflanzen Tumoren induziert wurden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob an den restlichen Pflanzen eine latente Infektion vorlag, die mit Hilfe künstlich erhöhter Wuchsstoffspiegel zur Tumorinduktion führen könnte.

In 4fach wiederholtem Versuch wurde jeweils von hochkonzentriertem Rohpreßsaft (9 g Tumorgewicht + 4,5 ml Puffer) eine

Verdünnungsreihe bis 1:10000 hergestellt. Mit jeder Konzentrationsstufe waren jeweils 10 Tabak-Hybriden mit je 0,4 ml zu inokulieren.
Die Endbonitur nach 6 Wochen Inkubationsdauer ergab als Mittelwert von 4 Versuchen folgendes Ergebnis:

| Verdünnung des Inokulums | Anzahl Pflanzen mit Tumoren in % ($\bar{x}$ von 4 Versuchen mit jeweils 50 Versuchspflanzen) |
|---|---|
| konzentriert | 100 |
| 1:10 | 75 |
| 1:100 | 52 |
| 1:1000 | 15 |
| 1:10000 | 10 |

Die Werte ergaben eine Annäherung an einen 50%igen Infektionserfolg bei einer Preßsaftverdünnung von 1:100. Aber nicht nur die Anzahl der Tumoren, sondern auch deren Größe verringerte sich mit zunehmender Verdünnung des Inokulums.

In einem Rücktest sollte die Virulenz der Tumoren aus der jeweiligen Verdünnungsstufe getestet werden. Da die Pflanzen mit der höchsten Inokulumverdünnung nicht genügend Tumoren gebildet hatten, um einen hochkonzentrierten Preßsaft herstellen zu können, wurden Sproßteile und Blättchen der inokulierten Gewebebereiche mitverwendet. Der Infektionsversuch ergab nach 6 wöchiger Versuchsdauer folgendes Ergebnis:

| Inokulum aus Tumoren der Verdünnungsstufen | Anzahl Pflanzen mit Tumoren in % ($\bar{x}$ von 4 Versuchen mit jeweils 50 Versuchspflanzen) |
|---|---|
| konzentriert | 100 |
| 1:10 | 95 |
| 1:100 | 100 |
| 1:1000 | 100 |
| 1:10000 | 20 |

Die Infektiosität war demnach bis auf die letzte Verdünnung nicht reduziert. Der TIF hatte sich vermutlich in den Tumorgeweben vermehrt oder war vermehrt worden, dagegen nicht in den inokulierten Gewebebereichen selbst und in den normal aussehenden Austrieben dieser Sproßstellen. Diese Pflanzenteile dürften somit den Preßsaft der letzten Probe verdünnt haben, was zu einer entsprechend niedrigen Erfolgsquote geführt hat.

Um die Wirkung von Wachstumsregulatoren auf die niedrige Infektionsrate zu prüfen, wurden Tabak-Hybriden mit jeweils 0,4 ml des 1:100 verdünnten Tumor-Inokulums infiziert und mit 0,05, 0,1, 0,5 und 1%igen NAA-, Kinetin- und Gibberellin-Lanolin-Pasten behandelt. Als Kontrolle dienten infizierte, unbehandelte Pflanzen. Pro Versuchseinheit standen 10 Pflanzen zur Verfügung.
Die Ergebnisse der Zwischen- und Endbonituren sind in Tabelle 6 zusammengestellt.
Nach 5 Wochen Inkubationsdauer hatten 6 von den 10 infizierten Kontrollpflanzen Neoplasien entwickelt. Dieser Wert differierte nicht wesentlich von der angestrebten 50%-Infektionsrate. Wie die Daten der Tabelle zeigen, hatten die Phytohormonbehandlungen zu keiner signifikanten Erhöhung der Anzahl der Pflanzen mit Tumorentwicklungen geführt. Berücksichtigt man bei der Auswertung dieses Versuchs eine möglicherweise sehr inhomogene Verteilung des TIF im Inokulum, sowie eine individuell unterschiedliche Bereitschaft der Pflanzen auf karzinogene Agenzien zu reagieren, bleibt auch hier als Ergebnis festzuhalten, daß exogen zugeführte Wachstumsregulatoren weder die Tumorkompetenz der Zellen noch die eigentliche Induktion zum Tumorwachstum veränderten. Eine latente Infektion konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 6

Tumorwachstum an Tabakhybriden nach Infektion mit 1:100 verdünntem Tumor-Inokulum und Phytohormonapplikation

| | Anzahl Pflanzen mit Tumorbildungen von jeweils 10 infizierten Versuchspflanzen | | |
|---|---|---|---|
| | Tage nach Versuchsbeginn | | |
| | 14 | 28 | 35 |
| Kontrolle | 3 | 6 | 6 |
| NAA 1 % | 2 | 4 | 4 |
| " 0,5 % | 1 | 5 | 6 |
| " 0,1 % | 1 | 6 | 7 |
| " 0,05 % | 2 | 5 | 6 |
| Kinetin 1 % | 4 | 6 | 6 |
| " 0,5 % | 2 | 5 | 5 |
| " 0,1 % | 4 | 5 | 7 |
| " 0,05 % | 4 | 6 | 6 |
| Gibb.säure 1 % | 2 | 5 | 5 |
| " 0,5 % | 1 | 5 | 5 |
| " 0,1 % | 3 | 6 | 7 |
| " 0,05 % | 4 | 6 | 7 |

### 3.3.4. Abhängigkeit der Tumorentwicklung vom Pflanzenalter

Mit zunehmendem Alter nimmt die Empfindlichkeit der Tabak-Hybriden zur Tumortransformation durch den TIF ab.
Das Altern einer Pflanze wird u.a. auch durch Phytohormone mitreguliert. So kann man eine Pflanze künstlich altern lassen, indem man ihren Vegetationspunkt entfernt. Treiben jedoch dann Seitenknospen, die nicht mehr unter der Apikaldominanzhemmung stehen, aus und produzieren selbst Auxin, so zirkuliert anschließend in der Pflanze mehr Auxin als vor der Dekapitierung.
Pflanzenverjüngung konnte dagegen oft künstlich durch Kinetinzugabe erreicht werden.
Wie auch VOM BERGE UND HERRENDORFF (1977) beobachtete, war es äußerst schwierig, an alten Tabakpflanzen Tumoren zu induzieren. Als physiologisch alt galten die Hybriden, wenn sie trotz Kurztagsbedingungen starkes Längenwachstum oder sogar Blütenansatz zeigten. In diesem Stadium induzierte die übliche Infektion keine Neoplasien mehr. VOM BERGE UND HERRENDORFF erreichte jedoch geringfügiges Tumorwachstum, wenn sie die alten Pflanzen kurz vor der Inokulation dekapitierte. Hiervon ausgehend sollte die Tumorbildungsfähigkeit von unterschiedlich alten Tabakpflanzen getestet werden. Zudem war zu untersuchen, ob eine Kinetinbehandlung einen günstigen Einfluß auf die Tumorentstehung an alten Pflanzen ausüben konnte.
Als Versuchspflanzen dienten 1) Kurztagspflanzen mit Blüten oder Blütenansatz, 2) ca. $2^1/_2$ Monate alte Kurztagspflanzen ohne Blütenansatz und 3) 6 Wochen alte Kurztagspflanzen. Jeweils 40 Pflanzen aus jedem Entwicklungsstadium wurden entweder a) wie üblich mit Tumorpreßsaft inokuliert, b) dekapitiert und mit TIF infiziert, c) zusätzlich zur Infektion mit Kinetin (0,5%) an der Sproßbasis behandelt oder d) dekapitiert, infiziert und mit Kinetin behandelt.
Die Dekapitierungsfläche wurde stets mit Lanolin verschlossen um die Regeneration des entfernten Vegetationspunktes hinauszuzögern.
Der Versuch wurde zweimal wiederholt.

Tabelle 7

Tumorentwicklung an unterschiedlich alten und in verschiedener Weise behandelten, infizierten Tabakhybriden 2, 4 und 6 Wochen nach Versuchsbeginn

| Zeit nach Versuchsbeginn (Wochen) | Anzahl Pflanzen mit Tumorbildungen von jeweils 30 infizierten Versuchspflanzen | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | | | 4 | | | 6 | | |
| Alter der Pflanzen zu Versuchsbeginn (Wochen) | 6 | 10 | 16 | 6 | 10 | 16 | 6 | 10 | 1 |
| Behandlungsweise: | | | | | | | | | |
| nur mit TIF infiziert | 9* | 0 | 0 | 30 | 10 | 0 | 30 | 11 | |
| dekapitiert, infiziert | 10 | 0 | 0 | 29 | 3 | 0 | 29 | 5 | |
| infiziert, Kinetinapplikation (0,5%) | 19 | 3 | 0 | 30 | 6 | 3 | 30 | 8 | |
| dekapitiert, infiziert, Kinetinapplikation (0,5%) | 14 | 0 | 0 | 28 | 2 | 0 | 28 | 4 | |

* $\Sigma$ von 3 Versuchen

Die in der Tabelle 7 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß bei den jungen Versuchspflanzen unabhängig von der Behandlungsweise der übliche hohe Infektionserfolg erreicht wurde. Kinetin förderte wiederum eine vorzeitige Tumorentwicklung, sowohl bei den 6 als auch bei den 10 Wochen alten Tabakhybriden. Außerdem ermöglichte die Kinetinbehandlung auch an den zu Versuchsbeginn bereits 16 Wochen alten Pflanzen noch Tumorentwicklung. Ebenso schien die Dekapitierung diese alten Pflanzen, wenn auch in ganz geringem Maße, wieder empfindlich zu machen.

Auffallend war das sehr späte Auftreten dieser Wucherungen. Die mittelalten Pflanzen reagierten mit deutlich verminderter Empfindlichkeit auf den TIF. Die höchste Anzahl transformierter Pflanzen konnte durch einfache Infektion erreicht werden, wohingegen Dekapitierung und Kinetinapplikation keine bessere Tumorinduktion ermöglichte.

### 3.4. Untersuchungen über Peroxidase-Aktivitäten im Tabakgewebe

Durch gelelektrophoretische Auftrennung von Peroxidase-Isoenzymen (PO) im Tabaksproß konnte WEGEN (1976) beobachten, daß einige Isoenzyme während bestimmter Entwicklungsstadien der nicht infizierten Pflanze und der mit TIF infizierten, tumorbildenden Pflanze aktiviert wurden. Über ihre Lokalisierung im Gewebe und ebenso über ihre Funktion ließ sich jedoch nichts aussagen. Diese Fragestellung sollte deshalb durch histochemische Untersuchungen neu bearbeitet werden.

Die histochemische PO-Anfärbung nach VAN DUIJN (1955) zeigte, daß dieses Enzym ubiquitär im Gewebe aktiv ist. Das gesamte Gewebe, ausgenommen Kambium und ausdifferenzierte Xylemzellen, färbte sich blau an. Die PO-Aktivität trat sowohl im Cytoplasma als auch in den Zellwänden auf. Peroxidase war zum Teil leicht löslich und reagierte bereits außerhalb der Zellen mit dem Medium, bevor dieses in das Gewebe eindringen konnte. Mit dieser Methode ließen sich jedoch keine quantitativen und qualitativen Unterschiede an PO-Aktivität im Gewebe feststellen. Deshalb war nach einer Methode zu suchen, mit der nach Möglichkeit einzelne Isoenzyme darzustellen sind. Da bekannt ist, daß PO-Isoenzyme unterschiedliche Hitzestabilität besitzen, wurde versucht, diese Eigenschaft zu einer differenziellen Unterscheidung im Gewebe auszunutzen. In wässrigem, neutralem Milieu waren die meisten Isoenzyme bis 90° C aktiv, die Gewebeschnitte färbten sich gleichmäßig blau. Senkte man den pH-Wert, so erniedrigte sich auch die Temperaturtoleranz. Das beste Ergebnis war mit einer Inkubation der Schnitte in Äthanol-Acetatpuffer (0,1 M, pH 4,5) für 10 Minuten bei 58° C zu erzielen. Die anschließende Färbung ergab

eine Lokalisierung von PO-Aktivität in wenigen, stets gleichen Zelltypen bzw. in Zellen gleichen physiologischen Zustandes.

### 3.4.1. Histochemische Untersuchungen über das Vorkommen von hitzestabilen PO-Isoenzymen

In unverletztem Tabakssproßgewebe waren nach Wärmebehandlung in Verbindung mit saurem pH-Wert verschiedene Isoenzyme ausgeschaltet. Eine Reaktivierung trat auch nach Inkubation über mehrere Stunden bei Zimmertemperatur nur geringfügig auf. Stark blau gefärbt und damit sehr PO-aktiv waren stets Zellinhalt und Wände von Zellen der Endodermis und ebenso die Siebzellen (Abb. 24). Diese Aktivität blieb während aller Entwicklungsstadien konstant hitzestabil. Positive Reaktionen traten darüberhinaus in Abschnitten der Epidermis, insbesondere in den Basiszellen von Haaren (Abb. 24), sowie in dem Blattknospen umgebenden Sproß- und Blattstielparenchym und im Blattstieltrenngewebe auf (Abb. 25). Hier waren vornehmlich die in den Zellwänden lokalisierten, weniger die cytoplasmatischen Isoenzyme aktiv. Alle anderen Gewebearten (Mark, Rinde, Xylem, Kambium) blieben in der Regel ungefärbt.

Die Farbintensität der hitzebehandelten, PO-aktiven Gewebe nahm von der Sproßspitze zur Basis hin zu: je älter das Gewebe, umso stärker war die Enzymreaktion. In Querschnitten durch die Sproßbasis konnte auch in den Protoplasten des Marks und der Rinde eine leichte Färbung auftreten.

In mit sterilem Puffer verletzten Pflanzen waren während des gesamten Untersuchungszeitraumes ähnliche Reaktionen wie in den unverletzten Proben zu beobachten. Zusätzliche PO-Aktivität trat jedoch in diesen Geweben im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen auf. Während an den beiden ersten Tagen nach Verwundung sich weder Heilungsreaktionen noch neue PO-Aktivitäten zeigten, so änderte sich ab dem 3. Tag das Bild. Die intakt gebliebenen Zellen am Wundrand rundeten sich ab, hypertrophierten und schoben sich in die Wundöffnung vor. Diese Zellen reagierten positiv auf PO-Anfärbung. Die Enzym-

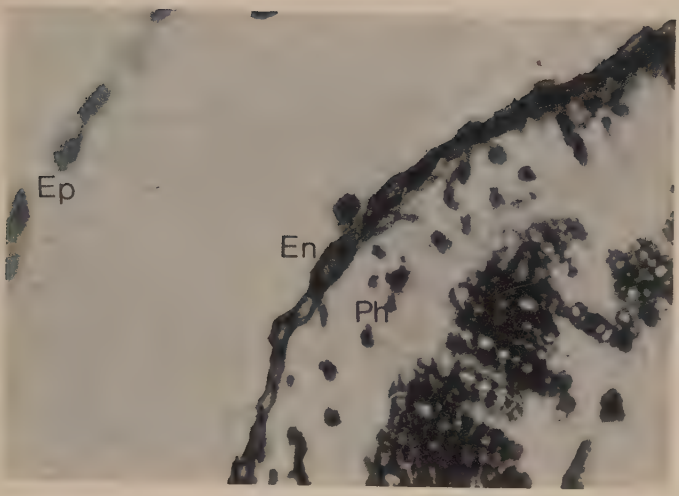



Abb. 24

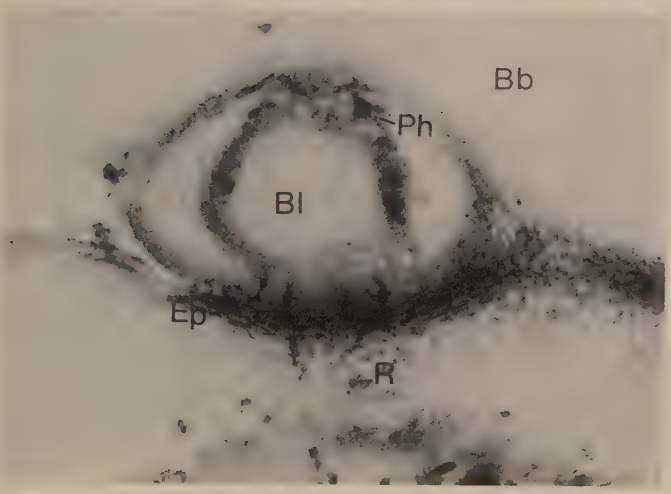



Abb. 25

Aktivität hitzestabiler Peroxidase-Isoenzyme im Tabakspro ß

Abb. 24: Positive Reaktionen in Endodermis (En), Epidermis (Ep) und Phloem (Ph)
(Xylemfärbung ist auf Ansammlung von Farbkristallen aus der Färbelösung zurückzuführen)(Vergr. 1:30)

Abb. 25: Aktivität um eine Blattknospe (Bl) in Sproßrinden-parenchym (R) und Epidermis (Ep). Innerhalb der Knospe lassen sich erste Phloemzellen (Ph) anfärben (Bb = Blattstielbasis) (Vergr. 1:14)

Aktivität war vor allem im Cytoplasma lokalisiert. Ebenso reagierten im weiteren zahlreiche Zellen, die selbst nicht sichtbar verletzt worden waren, aber im Wundbereich lagen. Dadurch kam häufig eine blau gefärbte Zone um die Verletzung zustande. Früher oder später setzten im Rahmen der Wundregeneration Zellteilungen um die Stichlöcher ein. Mit dem Beginn des Teilungsstadiums einer Zelle hörte die beobachtete PO-Aktivität auf. So entstanden ungefärbte meristematische Zellscheiden um die Wunden (Abb. 26). Die wundinduzierte Enzymaktivität blieb auf die intakt gebliebenen, noch nicht teilungsbereiten Wundrandzellen beschränkt. Nach ungefähr 6 Tagen änderte sich das Färbeverhalten der Wundzellen erneut: die ältesten, noch meristematisch erscheinenden Kalluszellen reagierten wieder positiv auf die Anfärbung. Morphologisch noch nicht sichtbare Differenzierungsprozesse waren somit bereits durch Veränderungen der Enzymaktivitäten erkennbar. Vorläufer von Wundtracheiden reagierten zunächst im Cytoplasma stark positiv. Die Enzymaktivität verlagerte sich dann zunehmend in die Zellwände und verlor mit weiterer Differenzierung und Ausbildung von Wandverstärkungen mehr und mehr an Intensität. Ausdifferenzierte Wundtracheiden waren, wie die übrigen Xylemelemente, stets ungefärbt.
Trotz histologischer Veränderungen in fortschreitenden Wundheilungsprozessen traten neue Aktivitäten von thermoresistenten PO-Isoenzymen nicht mehr auf. Junge Wundkalluszellen blieben stets inaktiv; ältere, in ersten Differenzierungsstadien befindliche Wundzellen reagierten positiv und ausdifferenzierte Zellen wiederum negativ.
Nach 14-tägiger Wundheilung waren die Stichlöcher weitgehend durch mehr oder weniger stark blaugefärbtes Wundgewebe zugeschoben, denn sobald sich diese Zellen zu Parenchymzellen differenzierten, hörte die wundinduzierte PO-Aktivität auf.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß hitzestabile Isoenzyme während bestimmter Zellentwicklungsstadien im Wundheilungsgeschehen aktiviert und wieder inaktiviert werden.

Die mit TIF infizierten Pflanzen glichen in ihrem PO-Färbeverhalten während der ersten 10 Tage vollkommen dem der ver-

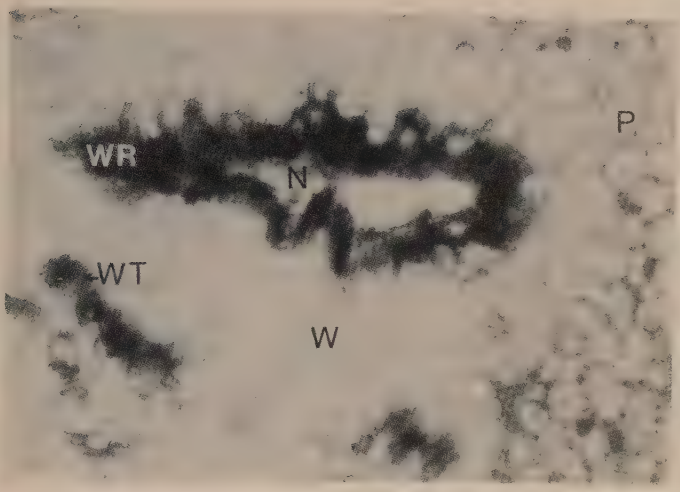



Abb. 26

Abb. 27

Aktivität hitzestabiler Peroxidase-Isoenzyme im Tabakgewebe

Abb. 26: Wundheilung um eine Nekrose (N) im Sproß mit ungefärbten, meristematischen Wundzellen (W), schwach positiv reagierenden Parenchymzellen (P) sowie stark blau gefärbten Wundrandzellen (WR) und jungen Wundtracheiden (WT) (Vergr. 1:28)

Abb. 27: Querschnitt durch eine junge, undifferenzierte TIF-Tumorprogression aus dem Tabaksproß (Vergr. 1:14)

letzten Kontrollen. Der Regenerationsprozeß während der Wundheilung induzierte hier die gleichen typischen, hitzeresistenten Peroxidasen, die zuerst am Wundrand aktiv wurden und dann auch im Wundkallus auftraten.
Ungefähr nach 2 Wochen entstanden aus den infizierten Sproßbasen kleinere Tumorwucherungen. Während ihrer Entstehung reagierte das rasch wachsende Gewebe, das vorwiegend aus meristematischen Zellen aufgebaut war, weitgehend negativ auf den PO-Färbeversuch.
Abbildung 27 zeigt einen Querschnitt durch einen kleinen Tumor, dessen Zellen nicht anfärbbar waren. Traten diese Zellen in frühe Differenzierungsstadien ein, so wurden hitzestabile PO-Isoenzyme aktiviert, gekennzeichnet durch eine leichte Blaufärbung des Grundgewebes. Die Aufhellung der eigenlich recht kräftigen PO-Färbung kam durch Überlagerung von inaktiven ungefärbten und aktiven blaugefärbten Zellen zustande. Sobald histologisch sichtbare Zelldifferenzierungen erkennbar waren, hörte die Aktivität der hitzestabilen Isoenzyme auf. Mit fortschreitender Tumordifferenzierung glichen sich dessen Zellen in ihrer Reaktion auf die VAN DUIJN-Reagenz immer mehr denen des Sproßgewebes an. Das parenchymatische Grundgewebe des Tumors blieb meist ungefärbt, ebenso alle Kambien und meristematischen Wachstumszentren. Auch die ausdifferenzierten Xylemelemente des Tumors reagierten stets negativ. Demgegenüber ließen sich alle Phloemelemente und, falls vorhanden, auch die Zellen der Endodermis blau anfärben (Abb. 28). Traten Nekrosen im Tumor auf, so reagierte das angrenzende Wundgewebe wie der Wundkallus im Sproß.

Auch bei den mit Agrobacterium infizierten Tabakpflanzen traten zunächst ausschließlich Wundheilungsreaktionen auf. Dementsprechend wurden die gleichen Aktivitäten der hitzestabilen PO-Isoenzyme im Wundgewebe des beimpften Sprosses sichtbar. Es reagierten primär die intakten, wundnah gelegenen Zellen mit der Induktion hitzeresistenter Peroxidasen. Deren Aktivität verschwand, sobald die Zellen in Teilungsstadien übergingen. Sie ließen sich wieder anfärben, sobald sie in frühe Differenzierungsphasen eintraten. Nach spätestens

10 Tagen war in diesen Geweben die Umstimmung zum Tumorwachstum morphologisch sichtbar. Wie im histologischen Teil dieser Arbeit beschrieben, traten zunächst Unregelmäßigkeiten im Teilungsmodus des Wundkallus sowie meristematische Zentren im Rindenparenchym auf. Auch hier ließen sich die meristematischen Zellen nicht anfärben. In den Zentren im Rindenbereich differenzierten sich sehr rasch Xylem und Phloem, letzteres war nach Zugabe der VAN DUIJN-Reagenz sofort an der dunkelblauen Anfärbung zu erkennen. Somit reagierten Tumor-Phloem und normales Sproß-Phloem gleichartig. Der histochemische Nachweis von thermostabilen PO-Isoenzymen im ausgewachsenen Tumor gelang wieder nur im Phloem, in jungen Xylemelementen und in Zellen der Endodermis.

Hieraus ist festzuhalten, daß neben den stets aktiven hitzestabilen PO-Isoenzymen im Tabaksproß neue Aktivitäten während der Wundheilung auftreten. Die gleichen Wund-induzierten Isoenzyme waren auch im Sproßgewebe der mit Tumorinokulum und mit Agrobacterium infizierten Pflanzen zu beobachten. Neue Tumor-spezifische Enzymaktivitäten konnten jedoch nicht festgestellt werden.

### 3.4.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von hitzestabilen PO-Isoenzymen

Eindeutig war in allen Gewebeproben, die bei 58° C inkubiert worden waren, eine geringere PO-Aktivität vorhanden als in den nicht hitzebehandelten. Welche Isoenzyme im einzelnen aktiv blieben, war durch elektrophoretische Auftrennung zu differenzieren.

Da nicht genügend Pflanzenmaterial zur Verfügung stand, um parallel zu histochemischen Untersuchungen alle 2-3 Tage eine Elektrophorese durchzuführen, wurden exemplarisch 4 typische Stadien der Aktivierung und Inaktivierung von hitzeresistenten Isoenzymen im Gewebe aufgetrennt.

Die Auftrennung der aus nicht erhitztem Gewebe extrahierten Peroxidasen (Kontrolle) ergab trotz abgewandelter Extraktionsmethoden qualitativ das gleiche Isoenzymmuster, wie WEGEN (1976) es für die Nicotiana-Hybriden beschrieben hat: 2 anodische und 2 kathodische Isoenzymgruppen. Die Anzahl der Isoenzyme selbst, sowie deren Aktivitätsstärke waren jeweils vom Entwicklungszustand des Gewebes abhängig.

Das Ergebnis der Auftrennung der hitzestabilen Isoenzyme 2 Tage nach Verletzung und Infektion im Vergleich zu den nicht erhitzten Kontrollen zeigt das Zymogramm der Abbildung 29. Die steril verletzten und die mit TIF infizierten Sproßgewebe waren sowohl bei histochemischer Anfärbung als auch bei elektrophoretischer Auftrennung in ihren enzymatischen Aktivitäten identisch. Das Zymogramm gilt demnach für beide Proben.

Die anodische Auftrennung ergab für den Kontrollextrakt die typischen 2 Isoenzymgruppen. Die langsam wandernde Gruppe bestand aus 2 Isoenzymen, die schnell wandernde aus 3 Zonen. Nach der 58° C-Behandlung blieben 2 deutliche Peaks in der langsam wandernden anodischen Gruppe unterscheidbar, während im Bereich der schnell wandernden Gruppe nur noch eine nicht weiter aufgetrennte Zone (4a) PO-Aktivität angab.

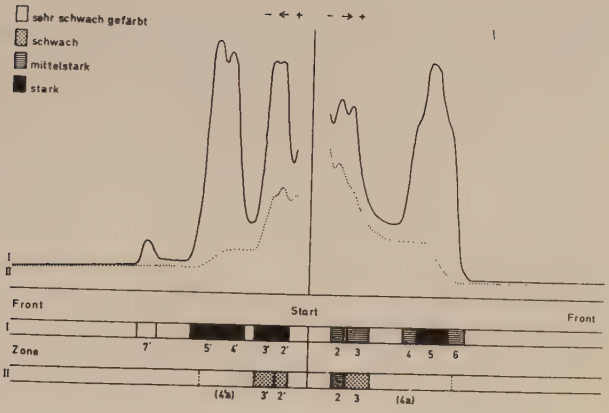



Abb. 29: Densitometrische Auswertung der Peroxidase-Isoenzyme im Tabakspro8 2 Tage nach Verwundung bzw. TIF-Infektion
—— I: unbehandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 25 µg/ml
...II: bei 58°C behandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 30 µg/ml

Im kathodischen Bereich zeigten die Kontrollen starke Aktivität. Die Isoenzyme ließen sich in 2 distinkte Gruppen mit je 2 Zonen in der langsam wandernden und in der schnell wandernden Gruppe einteilen. Dahinter folgte noch ein kleiner zusätzlicher Peak (7').
Die hitzeresistenten Isoenzyme waren in eine klar definierte langsam wandernde Gruppe mit 2 Zonen einzuteilen und im Bereich der schnell wandernden Gruppe ergab sich im Zymogramm nur wieder die nicht weiter auftrennbare Zone (4a').

Die Hitzebehandlung hatte demzufolge die Quantität der PO-Aktivität vermindert und in jeweils der 2. anodischen und 2. kathodischen Gruppe Isoenzyme ausgeschaltet.

9 Tage nach Verletzung und Infektion führten starke Wundheilungsprozesse im Gewebe zur Induktion neuer hitzestabiler Wundperoxidasen. Noch glichen sich die Vorgänge im verletzten Sproß und im infizierten Gewebe so sehr, daß das folgende Zymogramm (Abb. 30) für beide Proben repräsentativ ist.

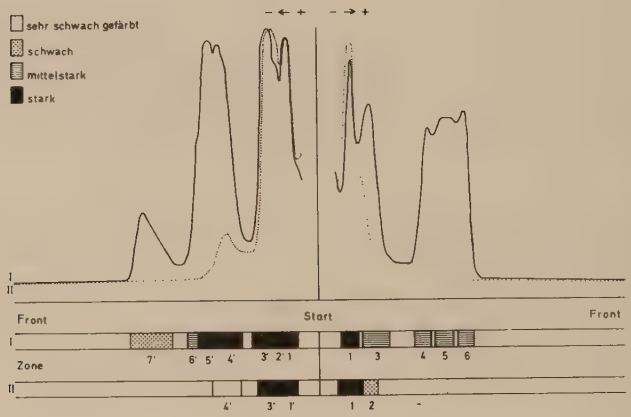



Abb. 30: Densitometrische Auswertung der Peroxidase-Isoenzyme im Tabaksproß 9 Tage nach Verwundung bzw. TIF-Infektion
—— I: unbehandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 25 µg/ml
...II: bei 58°C behandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 23 µg/ml

Anodisch war der Extrakt aus nicht erhitzten Geweben wieder in 2 Isoenzymgruppen aufzuspalten: einer langsam wandernden (2 Zonen) und einer schnell wandernden mit 3 Zonen. Die thermoresistenten Isoenzyme zeigten in der schnell wandernden anodischen Gruppe kaum oder keine Aktivität mehr, während sich in der 1. Gruppe 2 Zonen (1 und 2) differenzieren ließen. Die Aktivität der 1. Zone lag sogar noch über der des Kontroll-

extraktes.
Für beide Proben erwies sich die Gesamtaktivität der kathodisch wandernden Isoenzyme erhöht gegenüber den anodisch wandernden. Die beiden kathodischen Gruppen der Kontrolle bestanden je aus 3 Zonen sowie einer weiteren Zone (7').
Wie das Zymogramm verdeutlicht, blieb die Aktivitätsstärke der hitzeresistenten Isoenzyme in der langsam wandernden 1. Gruppe im Bereich der nicht erhitzten Kontrolle erhalten, obwohl die Wärmebehandlung eine Zone (2') ausgeschaltet hatte. Darüberhinaus war die PO-Aktivität in der 2. Gruppe sehr stark auf einen kleinen Peak vermindert worden, und im Bereich der angehängten Zone war jegliche Aktivität verschwunden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß gegenüber der 2-Tage-Probe eine allgemeine Aktivitätserhöhung der Peroxidasen eingetreten ist. Nach den Zymogrammen könnte die erhöhte Aktivität der Isoenzyme in den langsam wandernden anodischen und kathodischen Gruppen mit den anfärbbaren, wundinduzierten PO-Isoenzymen im Gewebe erklärt werden.

21 Tage nach Verletzung und Inokulation mit TIF war die eigentliche Wundreaktion im Tabaksproß abgeschlossen. Nur noch Restaktivitäten der PO konnten im Wundgewebe erkannt werden. Hinsichtlich dieser Isoenzyme bestand weiterhin kein erkennbarer Unterschied zwischen verletztem und infiziertem Gewebe, denn Wundheilungsphänomene waren allein auf das Sproßgewebe beschränkt, während der Tumor aus entarteten Blattanlagen außerhalb des Sprosses wucherte. Deshalb wurde das junge Tumorgewebe abgetrennt und gesondert vom Sproß aufbereitet, extrahiert und elektrophoretisch untersucht. Somit ist auch das folgende Zymogramm (Abb. 31) sowohl für verletzte als auch für infizierte Gewebe des Sprosses charakteristisch.
Die Kontrolle ließ sich anodisch in 2 Isoenzymgruppen mit jeweils 3 Zonen auftrennen. Die Aktivität der thermostabilen Isoenzyme lag deutlich unter der der Kontrollen. Zwar waren in der langsam wandernden Gruppe auch bei diesen Isoenzymen noch 3 Zonen unterscheidbar, in der 2. Gruppe beschränkte sich die ganze Aktivität jedoch auf die schwach ausgebildete Zone 4 a.

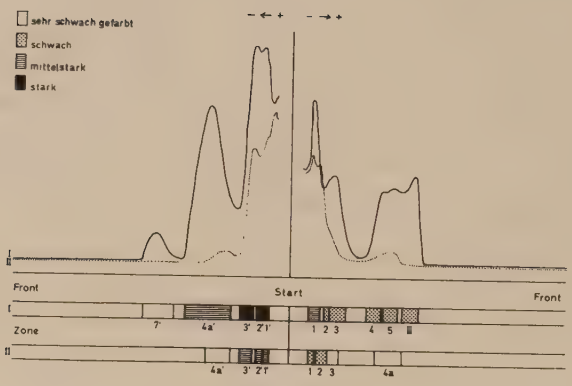



Abb. 31: Densitometrische Auswertung der Peroxidase-Isoenzyme im Tabaksproß 21 Tage nach Verwundung bzw. TIF-Infektion
—— I: unbehandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 22 µg/ml
...II: bei 58°C behandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 20 µg/ml

Die langsam wandernde kathodische Gruppe ließ sich sowohl im Extrakt der Kontrolle als auch im Extrakt nach Hitzebehandlung in je 3 Zonen differenzieren, die Aktivität der 2. Probe lag jedoch deutlich unter dem Kontrollniveau. Wieder zeigte das Zymogramm bei der Kontrolle einen 3. Peak nach der schnell wandernden Isoenzymgruppe. Dagegen war die PO-Aktivität der wärmebehandelten Probe in dieser schnell wandernden Gruppe wesentlich geringer, die Zone 7' fehlte ganz.

Nach densitometrischer Auswertung der Zonen im Gel ergab sich eindeutig, daß die Hauptaktivität der thermostabilen PO-Iso-

enzyme in den langsam wandernden Enzymgruppen lag. Damit glich sich das Aktivitätsmuster nach 3 Wochen wieder dem der Probe vor Beginn der sichtbaren Wundheilung an (2 Tage-Probe). Zum Unterschied von dieser Probe waren die Pflanzen inzwischen jedoch gealtert und gemäß der histochemischen Beobachtung ergab das Gesamtniveau der hitzestabilen Isoenzyme höhere Aktivität.

In der Abbildung 32 werden die Zymogramme der 3 hitzebehandelten Proben miteinander verglichen. Anstieg und Abfall der PO-Aktivität parallel zu den Wundheilungsvorgängen im Gewebe werden darin deutlich.

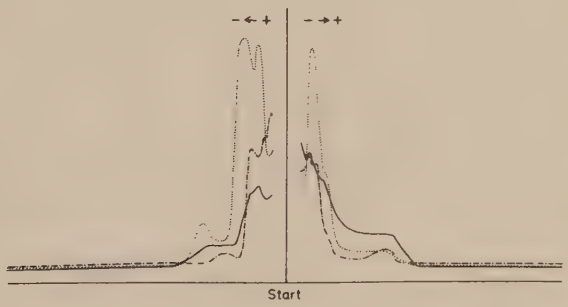



Abb. 32: Vergleich der Zymogramme der thermoresistenten Peroxidase-Isoenzyme im Tabaksproß 2 Tage (—), 9 Tage (...) und 21 Tage (· — ·) nach Verletzung bzw. TIF-Infektion

Die davon getrennt untersuchten Tumoren waren 21 Tage nach Infektion noch relativ klein und wenig differenziert.

Der Kurvenverlauf nach densitometrischer Messung der Gele ist im Zymogramm der Abbildung 33 dargestellt.

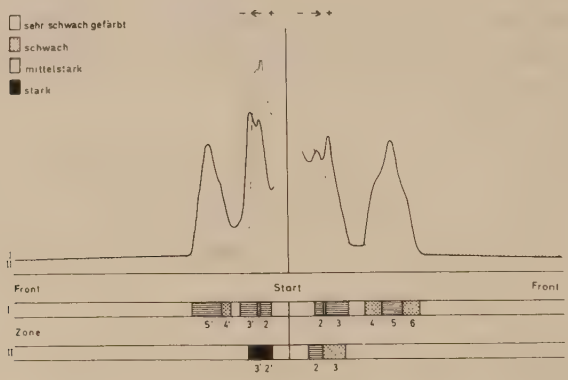



Abb. 33: Densitometrische Auswertung der Peroxidase-Isoenzyme im Tumorgewebe 21 Tage nach TIF-Infektion
—— I: unbehandelte Probe, aufgetragene Proteinmenge 18 µg/ml
...II: bei 58°C behandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 20 µg/ml

Die Extrakte der Kontrollpflanzen ergaben wieder die bekannten 2 Isoenzymgruppen jeweils im anodischen und kathodischen Feld. Die zusätzlich auftretende Zone im Sproß bei kathodischer Wanderung war im Tumorgewebe nicht vorhanden. Nach Wärmebehandlung waren in beiden Feldern die Aktivität der schnell wandernden Gruppen verschwunden. Zur Anode wanderten 2 Isoenzyme,

zur Kathode ebenfalls 2, deren Aktivität deutlich über der der Kontrolle lag.

Das Enzymmuster eines $2^{1}/_{2}$ Monate alten, ausdifferenzierten und ausgewachsenen Tumors ist im Zymogramm der Abbildung 34 wiedergegeben.

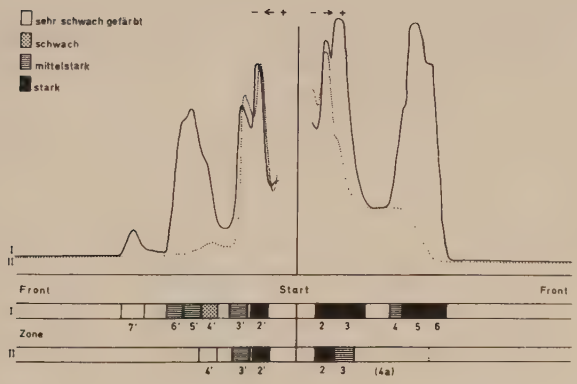



Abb. 34: Densitometrische Auswertung der Peroxidase-Isoenzyme im Tumorgewebe $2^{1}/2$ Monate nach TIF-Infektion
—— I: unbehandelte Probe; aufgetragene Proteinmenge 19 µg/ml
...II: bei 58°C behandelte Kontrolle; aufgetragene Proteinmenge 18 µg/ml

Die anodische Trennung des Kontrollextraktes ergab 2 sehr aktive Isoenzymgruppen. Die langsam wandernde Gruppe bestand aus 2, die schnell wandernde aus 3 Zonen. Der Extrakt aus der wärmebehandelten Probe ließ sich in der 1. Gruppe ebenfalls in 2 Zonen differenzieren. Die Aktivität der Zone 2 war gleich hoch mit der Kontrolle, die der Zone 3 viel niedriger.
Diese 1. anodische Gruppe lief in Form einer Schulter im

Bereich der 2. Isoenzymgruppe aus.
Im kathodischen Bereich waren im Extrakt der unerhitzten Kontrolle wiederum 2 Gruppen nachweisbar, mit 2 Zonen in der ersten und 3 in der zweiten Gruppe, sowie einer zusätzlichen Zone 7'.
Nach der Wärmebehandlung differenzierten sich in der langsam wandernden kathodischen Gruppe 2 Zonen, die die gleiche Enzymaktivität wie die Kontrolle aufwiesen; dagegen war kaum mehr erkennbare PO-Aktivität in der 2. Gruppe vorhanden und keine im Bereich der nachfolgenden Zone. Die Wärmebehandlung hatte somit die Enzymaktivität quantitativ reduziert und in qualitativer Hinsicht einige Isoenzyme inaktiviert.
Das Zymogramm der Abbildung 35 zeigt in Gegenüberstellung die beiden Kurven hitzestabiler PO-Enzymaktivitäten von jungem und altem Tumorgewebe.

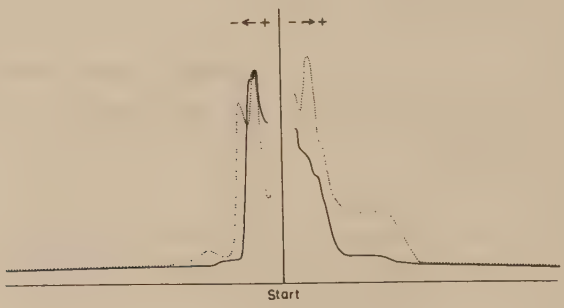



Abb. 35: Vergleich der Zymogramme der thermoresistenten Peroxidase-Isoenzyme im Tumor 21 Tage (—) und $2^1/2$ Monate (---) nach TIF-Infektion

Mit zunehmendem Alter des Tumorgewebes stieg die Gesamtaktivität der thermoresistenten Isoenzyme an, wohingegen sich die Anzahl der auftrennbaren Isoenzyme nicht veränderte.

### 3.4.3. Trennung der Peroxidase in lösliche, ionisch und kovalent gebundene Isoenzyme

Histochemisch war in den Schnitten eindeutig cytoplasmatische von Zellwand-gebundener PO-Aktivität zu unterscheiden.
Da mit den üblichen Methoden lösliche und, infolge des NaCl-Zusatzes zum Extraktionspuffer, auch ionisch gebundene Isoenzyme extrahiert wurden, versprach eine noch differenziellere Extraktion weitere Erkenntnisse über die Lokalisierung bestimmter Isoenzyme.
Für die Extraktion wurden gut entwickelte, nicht weiter behandelte Sproßstücke verwendet. Die löslichen Isoenzyme waren leicht mit Puffer zu extrahieren. In einem 2. Verfahren wurden anschließend die ionisch in die Zellwand gebundenen Enzyme herausgelöst, und durch Mazeration des Zellgewebes waren die mit obigen Methoden nicht extrahierbaren, kovalent gebundenen Isoenzyme zu gewinnen. Diese 3 Extrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die durchgezogene Linie in Abbildung 36 stellt die PO-Aktivität der löslichen Isoenzyme dar. Eindeutig ist zu erkennen, daß diese Fraktion die meiste Aktivität enthielt. Alle 4 Isoenzymgruppen sind deutlich aufgetrennt mit allen bisher bekannten Zonen. Die ionisch gebundenen Isoenzyme (gepunktete Linie) zeigte in der 1. anodischen Gruppe eine stark verringerte Aktivität.
Trotzdem war hier noch eine Aufteilung in 3 Zonen möglich. Dagegen waren die Zonen in der schnell wandernden anodischen Gruppe relativ aktiv. Qualitativ ergab sich ebenfalls kein Unterschied. Die ionisch gebundenen Isoenzyme, die zur Kathode wanderten, ließen sich weiterhin in 2 Gruppen aufteilen. Die Aktivität in der 1. Gruppe lag unter der des löslichen Extraktes, die der 2. Gruppe darüber. Qualitativ ergab sich im Enzymmuster kein Unterschied. Demnach dürften wohl alle löslichen Isoenzyme auch in die Zellwand durch ionische Bindung einzulagern sein.

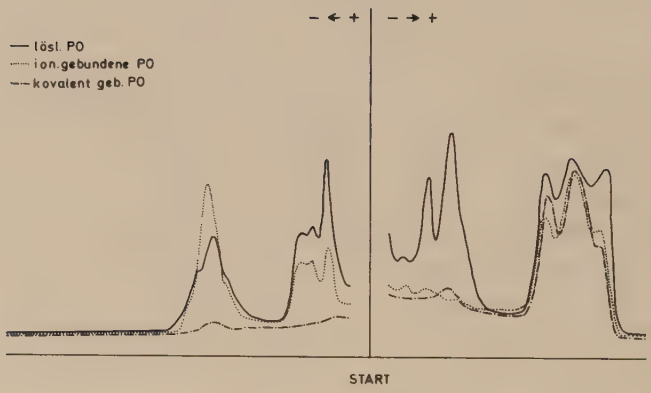



Abb. 36: Densitometrische Auswertung der löslichen, ionisch und kovalent gebundenen Peroxidase-Isoenzyme im Tabakspro ß
Aufgetragene Proteinmenge: jeweils 10 µg/ml

Die Aktivität der restlichen, kovalent in die Zellwand gebundenen Isoenzyme ist im Zymogramm durch die Strich-Punkt-Linie wiedergegeben. Zur Anode hin trat eine Isoenzymgruppe mit relativ hoher Aktivität in der schnell wandernden Gruppe auf, während in der langsam wandernden nur eine Zone sehr schwach ausgebildet wurde. Die kathodische Auftrennung ergab kaum noch Enzymaktivität: keine in der langsam wandernden

Gruppe und ein schwacher Peak in der 2. Gruppe. Die kovalent gebundenen Isoenzyme entfalteten folglich ihre Hauptaktivität im anodischen Bereich der schnell wandernden Gruppe.

### 3.5. Histochemische Lokalisierung von Phenoloxidase im Tabakgewebe

Die Untersuchungen über Peroxidase-Aktivitäten von WEGEN (1979) haben ergeben, daß den Peroxidasen in Tabakextrakten sowohl allgemeine Peroxidase- als auch IAA-oxidase- und Polyphenoloxidase-Funktion zukommen. Der Versuch, IAA-oxidase histochemisch im Gewebe darzustellen, mißlang. In den frischen Gewebeschnitten war es nicht möglich, die vorhandenen, IAA-oxidase-inhibierenden Phenole zu entziehen oder zu inaktivieren.

Demgegenüber gelang die histochemische Darstellung von Polyphenoloxidase-Aktivitäten (PPO). Als Substrate für den Enzymnachweis wurden Brenzkatechin und DOPA verwendet. Entsprechend lassen sich die beobachteten Oxidase-Aktivitäten als o-Diphenoloxidase oder im 2. Fall als DOPA-Oxidase bezeichnen.
Eine entwicklungs- und verletzungsabhängige Beobachtung der PPO wurde nicht vorgenommen, weil diese Oxidase-Funktion für die vorliegenden Untersuchungen von zweitrangiger Bedeutung war. Histochemisch sollte jedoch festgestellt werden, ob möglicherweise der hitzestabilen Peroxidase auch PPO-Funktion zukommt oder wieweit im nichterhitzten Gewebe PPO-Aktivität nachweisbar ist. Verglichen wurden Frischschnitte von unverletztem Tabakgewebe, von verletztem Sproßgewebe mit 5tägiger und 3wöchiger Wundheilung und von Tumoren.
Die Sproßquerschnitte reagierten nur im Bereich von Blattknospen deutlich positiv auf den Enzymnachweis, und zwar in den wachstumsaktiven Zentren. Auffallend war die Braunfärbung der Kerne mit dunkelbraunen Nucleoli. PPO-Aktivität beschränkte sich vorwiegend auf das Cytoplasma. In älteren Geweben, besonders im Mark, konnten auch Zellwände braun gefärbt sein.

Die Wundheilungsvorgänge hatten ebenfalls in einigen Proben zu einer cytoplasmatischen Braunfärbung des Wundgewebes geführt. Querschnitte durch das Tumorgewebe zeigten bereits an der viel stärkeren Braunfärbung des Reaktionsmediums, daß hier mehr PPO enthalten sein mußte als im Sproß. Das neoplastische Gewebe demonstrierte auch die deutlichste und differentiellste PPO-Aktivität. Wie die Abbildung 37 beweist, lag eindeutige Braunfärbung in allen wachstumsaktiven Bereichen des Tumors vor. Besonders fallen die randlich gelegenen Auswüchse auf. Es waren dies Gewebe, die sich in frühen, noch nicht histologisch sichtbaren Differenzierungsstadien befanden. Sobald nämlich parenchymatische Differenzierungen (Interzellularbildungen) auftraten, verlief der Enzymnachweis negativ.

Wurden die Pflanzengewebe vor der Behandlung auf 58° C erwärmt, so konnte keine PPO-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Daraus folgt, daß diese PPO-Funktion nicht den hitzestabilen Peroxidase-Isoenzymen zukommt.

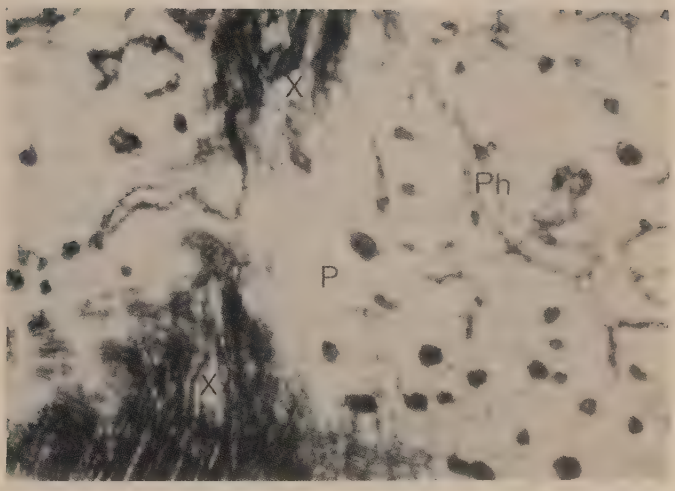



Abb. 28: Querschnitt durch einen differenzierten TIF-Tumor mit hitzestabiler Peroxidase-Aktivität im Phloem (Ph) und nicht reagierendem Xylem (X) und Parenchym (P) (Vergr. 1:14)

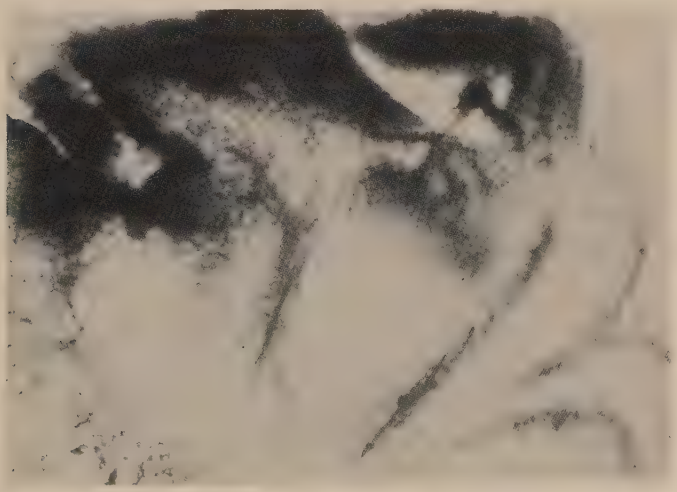


Abb. 37: Polyphenoloxidase-Aktivität in peripheren, wachstumsaktiven Bereichen eines TIF-Tumors (Querschnitt) (Vergr. 1:14)

## 3.6. Phenoluntersuchungen

Nach RABIN und KLEIN (in REEVE, 1959) inhibieren verschiedene Phenole der o-Dihydroxygruppe, vor allem Chlorogensäure und Kaffeesäure, eine spezifische Funktion der Peroxidase nämlich die Indolessigsäure (IAA)-Oxidation im Gewebe.
Eine erhöhte IAA-Konzentration, die in anderen pflanzlichen Tumoren nachgewiesen ist, könnte infolge einer Hemmung des abbauenden Enzyms IAA-oxidase zustande kommen. Diese Hypothese bietet sich zur Erklärung wachstumsregulatorischer Vorgänge im Tumor an.
Zunächst wurde versucht, o-Diphenole histochemisch im Gewebe zu lokalisieren und dann extrahierte Phenole dünnschichtchromatographisch aufzutrennen und zu bestimmen.

### 3.6.1. Reagenzien zum Nachweis von Phenolen

Phenole liegen selten als singuläre Verbindungen im Gewebe vor, sondern meist als Gemisch unterschiedlicher phenolischer Komponenten. In den histochemischen Untersuchungen waren deshalb Reinsubstanzen und Gemische von o-Diphenolen in wässriger Lösung mit den Nachweisreagenzien von VORSATZ und HOEPFENER (in REEVE, 1959) sowie mit ARNOW's-Reagenz (nach JOHNSON und SCHAAL, 1957) auf charakteristische Färbungen zu testen.
Alle Lösungen von Phenolen ohne Diphenolcharakter ergaben mit diesen Chemikalien eine schwache gelbe oder meist keinerlei Farbreaktion. Die o-Diphenole, sowie reines Methanol und der Tumorextrakt in Methanol zeigten folgendes Färbeverhalten:

| Testlösungen | nach Zufügung von | |
|---|---|---|
| | VORSATZ/HOEPFENER- | ARNOW-Reagenz |
| Brenzkatechin ($10^{-3}$M) | kirschrot | kirschrot |
| Kaffeesäure ($10^{-3}$M) | braunrot | bräunlich |
| Chlorogensäure ($10^{-3}$M) | kirschrot | kirschrot |
| Quercetin ($10^{-3}$M) | gelbbraun | gelbbraun |
| Methanol (Extraktionsmittel) | farblos | farblos |
| Tumorextrakt | kirschrot | kirschrot |

Phenolgemische ergaben nur dann kirschrote Färbung, wenn entweder der Brenzkatechin- oder der Chlorogensäure-Anteil deutlich überwog. Starke Verdünnungen der Lösungen hellten die Farbintensität entsprechend auf.
Nach diesem Vorversuch war eine relativ differenzielle Färbung bestimmter Phenole möglich. Im Gewebe konnte demnach auf den dominierenden Phenolanteil geschlossen werden, der dann in parallel laufender Dünnschichtchromatographie genauer zu charakterisieren war. Exaktere Angaben über die Phenolkonzentration im Gewebe ließen sich nicht machen, da ein entsprechendes Photometer nicht verfügbar war.

### 3.6.2. O-Diphenol-Lokalisierung im Verlauf von Wundheilung und Tumorwachstum

Histochemisch war nachzuweisen, wieweit Inhibitoren der IAA-Oxidase, nämlich Kaffeesäure und Chlorogensäure, die mit der VORSATZ/HOEPFENER-Reagenz braunrot bzw. kirschrot reagierten, vorhanden waren.

Um normale, entwicklungsabhängige Phenolveränderungen im Gewebe als Kontrolle den pathologisch veränderten Proben gegenüberstellen zu können, wurden Schnitte durch unverletzte Tabakpflanzen angefärbt. Häufig war in den verletzten Geweben zu beobachten, daß die mit Tumorpreßsaft inokulierten Pflanzen stärker nekrotisch reagierten als die Kontrollpflanzen nach Pufferinokulation. Nekrotische Reaktionen wiederum induzieren

oft starke Phenolansammlungen.

Gewebeproben wurden 1 bis 35 Tage nach Versuchsbeginn auf o-Diphenolgehalt untersucht.
1 Tag nach Versuchsbeginn waren nach Zugabe des Phenolreagenz in Querschnitten durch den unverletzten Tabaksproß Vegetationspunkte leuchtend rot angefärbt. Der Farbton entsprach dem der Vergleichslösungen von Brenzkatechin oder Chlorogensäure. Blattknospen und junge Blattaustriebe aus Blattachseln waren eher orangerot gefärbt. In manchen Schnitten reagierten auch Blattspur oder der parenchymatische Bereich der Blattlücke orange oder rot.
In den mit Puffer, nicht infektiösem und infektiösem Preßsaft inokulierten Sproßgeweben traten dieselben Farbreaktionen wie in den unverletzten Kontrollen auf. Die Stichlöcher begannen sich nekrotisch abzugrenzen, ohne erkennbare Veränderungen im Phenolgehalt hervorzurufen. Auch hier fiel wieder der rote Vegetationspunkt, die orangeroten Knospen und das hellrot gefärbte Blattspurgewebe auf. Die Färbung der Blattspur erstreckte sich vom inneren Phloem bis zur Blattstielbasis.

In Serienschnitten konnte beobachtet werden, daß solche Blattspurfärbung unterhalb von Blattprimordien und dort, wo Blätter abfielen, auftrat. Im Querschnitt war in einer Probe bereits andeutungsweise eine Trennschicht an der Blattbasis zu erkennen. In der Trennschicht hatten einzelne Zellen einen intensiveren orangeroten Farbton angenommen.
Die Phenole waren vorwiegend vakuolär lokalisiert. Die Färbereagenzien ließen die Zellen stark quellen, und der Inhalt dieser Zellen lief leicht aus, wodurch die Färbung rasch verblaßte. Auch der Versuch, die durch die Gasbildung während des Färbevorganges entstandenen Blasen aus dem Gewebe zu entfernen, verlief auf Kosten der Farbintensität. Längeres Stehenlassen der gefärbten Schnitte führte ebenfalls zu einer Aufhellung. Die Farbintensität war außerdem von der Schnittdicke abhängig. Die auslaufende Farbe der löslich gewordenen Phenole konnte ihre Lokalisierung verwischen, so daß die positiv reagierenden Gewebebezirke oft anhand parallel geschnittener, ungefärbter Kontrollschnitte genauer bestimmt

werden mußten.

Die unverletzten Sproßgewebe zeigten während des gesamten Untersuchungszeitraums dieselben Farbreaktionen wie am ersten Tag, während Querschnitte durch das 2 Tage alte verwundete Gewebe zusätzliche positive Reaktionen am Wundrand aufwiesen. Einzelne oder auch Gruppen von intakt gebliebenen Zellen in Wundnähe färbten sich im Cytoplasma leuchtend rot.

Die mit Pflanzenpreßsaft inokulierten Sproßgewebe reagierten deutlich stärker als die mit Puffer verletzten Pflanzen. In der Regel waren die Stichlöcher von einem rot gefärbten Ring positiv reagierender Zellen umgeben. Außerdem zeigte sich, daß die Phenolfärbungen im Wundbereich in oberen Sproßteilen intensiver waren als in tieferen. Die Färbungen von Vegetationspunkt, Knospen und Blattlückengewebe blieb auch hier gleich. Sämtliche gefärbten Gewebepartien lagen stets wie Inseln in ungefärbter Umgebung.

In den mit Puffer verletzten Pflanzen hatte 4 Tage nach Versuchsbeginn die Bildung von wundmeristematischem Gewebe eingesetzt. Das sich vom Kambium abgliedernde Wundgewebe war meist breiter und intensiver rot gefärbt als das aus dem Parenchym hervorgehende Gewebe. So waren sämtliche Verletzungen von einem mehr oder weniger breiten, leuchtend roten Wundgewebering umgeben. In Teilung begriffene Zellen färbten sich jedoch nicht an. Dementsprechend blieben Kambium und Wundmeristem stets ungefärbt.
Der qualitativ gleiche, teils noch stärkere Phenolnachweis gelang auch in den mit Preßsaft inokulierten Tabakssprossen. Wie die Abbildung 38 zeigt, wurden die Stichlöcher von leuchtend roten Zellmassen zugeschoben. Oft reagierten auch Zellen der Endodermis und einzelne hypertrophierte Kalluszellen, die sich in die Wundöffnung vorschoben, mit hellrot gefärbtem Zellinhalt. Die Farbintensität hing eindeutig von der Stärke der Heilungsprozesse ab.
Da im infizierten Sproß bisher nur Wundheilungsvorgänge sichtbar abliefen, waren sämtliche Phenolanhäufungen und Nachweisreaktionen identisch mit denjenigen in nicht infi-

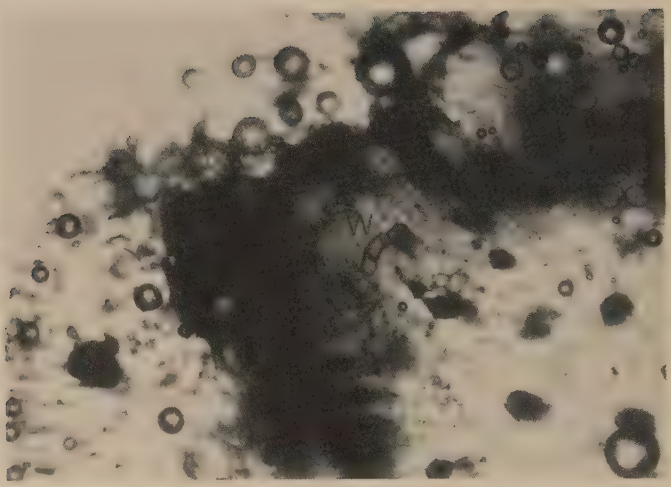



Abb. 38: O-Diphenole im Wundgewebe (W) des Tabaksprosses (Vergr. 1:28)

Abb. 39: O-Diphenole in einer jungen TIF-Tumorprogression (T) (Vergr. 1:28)

zierten, verwundeten Pflanzen. In einem Schnitt wiesen peripher gelegene Kambiumzellen, die zur Differenzierung übergingen, hellrote cytoplasmatische Färbung auf.
Dieses Färbeverhalten änderte sich auch in den Proben vom 7. und 10. Tag nicht.

14 Tage nach Versuchsbeginn begann in einigen Gewebeproben die Wundkallusfärbung bereits wieder abzunehmen. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Kalluszellen während und nach Differenzierungsprozessen ihre Anfärbbarkeit verlieren, weil die Phenole in Stoffwechselvorgänge eingehen und nicht mehr histochemisch lokalisiert werden können. Die Färbung des teildifferenzierten Wundgewebes erschien deshalb häufig aufgehellt und mehr orange-rosa, entweder durch Verdünnungseffekt infolge der verringerten Anzahl von positiv reagierenden Zellen oder/und durch Dominanz anderer Phenolverbindungen. An den infizierten Pflanzen waren erste tumorartige Auswüchse aus der Sproßbasis und den Blattachseln zu erkennen. In Querschnitten durch Sproß und Tumorknötchen reagierten die winzigen, undifferenzierten Wucherungen leuchtend rot (Abb. 39). In den Sproßquerschnitten selbst blieben wundinduzierte Phenole nachweisbar, ihre Farbintensität ließ jedoch wie in den verletzten Kontrollpflanzen mit fortschreitender Differenzierung nach.

Die Wundheilungsvorgänge in den verwundeten und infizierten Pflanzen waren 18 Tage nach Versuchsbeginn weitgehend abgeschlossen. Nur das nicht sichtbar differenzierte Wundgewebe enthielt noch anfärbbare Phenolkomponenten. Die Wundheilung erschien in den infizierten Geweben unbeeinflußt durch die austreibenden Wucherungen. Regeneration und Tumorwachstum sind offenbar physiologisch nicht direkt korreliert.
In Tumorquerschnitten färbten sich alle peripheren kleinzelligen Tumorauswüchse ebenso wie die randlich im ungefärbten parenchymatischen Grundgewebe liegenden Wachstumszentren intensiv kirschrot. Diese rote Färbung war niemals so intensiv in Sproßgeweben zu beobachten. Sie zeigte eine konzentrierte Ansammlung von o-Diphenolen in bestimmten Gewebebereichen des Tumors an. In älteren, ausdifferenzierten

Protrusionen ließ die Farbintensität wieder deutlich nach. In Querschnitten durch einen relativ amorph gestalteten Tumor fiel ein peripher verlaufendes Band rotgefärbter Zellen auf. Von dieser Zone zogen Ausläufer in die kleinen randlichen Tumorauswüchse hinein. Auch das angrenzende Gewebe war rötlich gefärbt. Nach Lage und Form dieses Zellstreifens könnte es sich um die Anlage von Leitgewebe handeln.

In den Proben 22 und 28 Tage nach Versuchsbeginn zeigten die Gewebe der verletzten Pflanzen nach Zugabe der Phenolreagenz wieder übereinstimmende Farbreaktionen mit denen der unverletzten Pflanzen. Nur noch an wenigen Stellen im Wundgewebe des Sprosses ließen sich charakteristisch rot gefärbte o-Diphenole nachweisen. Demgegenüber waren in allen wachstumsaktiven Teilen der Wucherungen leuchtend kirschrot anfärbbare Phenolverbindungen zu beobachten. Das parenchymatische Grundgewebe mit kambialen Zellen und Leitgeweben war stets ungefärbt. Einige undifferenzierte Bereiche reagierten rosa oder orangefarben. Die kleinen blattähnlichen Auswüchse enthielten wiederum hohe o-Diphenol-Konzentrationen.

Nach 35 Tagen war das Tumorgewebe gealtert, und mit der abnehmenden Wachstumsbereitschaft nahm auch der Gehalt an Brenzkatechinderivaten ab. Noch war das ungefärbte Grundgewebe jedoch von roten Adern und Zentren durchzogen. Ebenso zeigte peripheres, wachstumsaktives Gewebe noch die typische Anfärbung. Je älter und differenzierter aber die Tumorgewebe waren, umso geringer wurde auch der histochemisch nachweisbare Anteil an o-Diphenolen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die histochemische Färbemethode nach VORSATZ & HOEPFENER differenziell die o-Diphenole anfärbte. Von dieser Phenolgruppe traten im Verlauf von Wundheilung und Tumorentwicklung die leuchtend rot anfärbbaren Komponenten hervor. Anhand der Färbung von Vergleichslösungen dürfte es sich dabei um Brenzkatechin und/oder um Chlorogensäure handeln. Eine genauere Analyse erfolgte durch dünnschichtchromatographische Auftrennung von Gewebeextrakten.

### 3.6.3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Phenolen aus Gewebeextrakten im Verlauf von Wundheilung und Tumorentwicklung

Da im histologischen Bild mit Überlagerungen und Interferenzen verschiedener phenolischer Verbindungen gerechnet werden muß, wurden die gleichen Pflanzengewebe, die der histochemischen Untersuchung dienten, für die Chromatographie verwendet. Dazu reichten 0,2 g Frischgewicht für eine befriedigende Phenolextraktion aus, so daß exakt vergleichbare Gewebeteile herauspräpariert werden konnten.

Im Vorversuch wurde der Methanolextrakt von jungem Tabakssproßgewebe mit $10^{-3}$ M Lösungen von Brenzkatechin, Kaffeesäure und Chlorogensäure in Methanol verglichen. Ausgehend von der Beobachtung, daß sowohl Brenzkatechin als auch Chlorogensäure leuchtend rote Farbreaktion zeigten und deshalb im Gewebe nicht zu unterscheiden waren, sollte festgestellt werden, wieweit chromatographisch eine Trennung möglich war.
Nach dem Chromatogramm in Abbildung 40 hatten Brenzkatechin (Bk) und Kaffeesäure (Ks) fast gleiche $R_f$-Werte ($R_f$ = 0,76-0,78) und waren damit ganz eindeutig von Chlorogensäure (Cs) zu unterscheiden ($R_f$ = 0,48). Brenzkatechin fluoreszierte im Gegensatz zu den beiden anderen Phenolen nicht, färbte sich aber nach Ansprühung mit $Na_2CO_3$ und Folin-Ciocalteus-Reagenz (FCR) ebenso blau-violett an.
Der phenolische Extrakt aus einem jungen Tabakssproß ($K_1$), der histochemisch nur im Vegetationspunkt die kirschrote Färbung besaß, enthielt offenbar lediglich Chlorogensäure. Weder Brenzkatechin noch Kaffeesäure waren chromatographisch nachweisbar. Die Konzentration von Chlorogensäure lag allerdings weit unterhalb der $10^{-3}$M Vergleichslösung. Chlorogensäure war demnach im Pflanzengewebe nur in Spuren vorhanden.
Alle anderen fluoreszierenden und absorbierenden Flecke der Probe reagierten in keinem Fall mit dem Phenolreagenz.

Die aufgetrennten Phenole aus Extrakten von unverletztem ($K_1$), mit Puffer ($K_2$) und mit Preßsaft ($K_3$) inokuliertem und mit TIF (TIF) infiziertem Tabakssproßgewebe 1 Tag nach Versuchsbe-

ginn sind in Abbildung 41a dargestellt. Als Vergleichssubstanz diente eine $10^{-3}$M Chlorogensäurelösung.

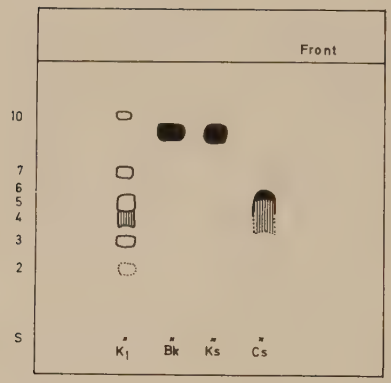



Abb.40: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Pflanzenextrakt ($K_1$), Brenzkatechin (Bk), Kaffeesäure (Ks) und Chlorogensäure (Cs). Auswertung im langwelligen UV-Licht und nach Ansprühen mit FCR (schraffiert: hellblaue Färbung nach FCR Behandlung; schwarz: stark blau-violette Färbung).

Sämtliche Proben ergaben 7 Flecke, wobei in der $K_1$-Probe die Komponente mit dem kleinsten $R_f$-Wert nur sehr schwach reagierte. Die $R_f$-Werte, als Mittelwerte sämtlicher Chromatogramme, sowie die Farbgebung der Flecke im langwelligen UV-Licht und nach Besprühung mit der Phenolreagenz sind der Tabelle 8 zu entnehmen.
Wie auf dem Chromatogramm zu erkennen ist, läuft der Chlorogensäurefleck nach unten hin zu einem langgezogenen Schweif aus. In diesem Bereich lag die Zone 4 in sämtlichen Proben. Sie stimmten mit dem Chlorogensäureschweif in der Farbe der Fluoreszenz und der Färbung nach FCR-Behandlung überein. Es fiel jedoch auf, daß lediglich die Zone 5 im UV-Licht stark blau fluoreszierte. Hier trat nach FCR-Besprühung in den Proben $K_3$ und TIF die für Chlorogensäure charakteristische Reaktion auf. Nimmt man an, daß die Ausdehnung der Flecke konzentrationsabhängig ist, so wäre demnach der Chlorogensäuregehalt in den Proben $K_3$ und TIF gegenüber den anderen Proben infolge der Verwundung mit Pflanzenextrakt bereits nach dem ersten Tag erhöht.

Die Auftrennung und Charakterisierung der Phenolextrakte 2 Tage nach Versuchsbeginn zeigt die Abbildung 41b. Im langsam wandernden Bereich trat in allen Proben eine weitere fluoreszierende Zone hervor. Sie steht demnach nicht in Beziehung mit Verletzungsreaktionen. Nach Behandlung mit FCR färbten sich die Zonen 4 und 5 (schraffiert) in den Extrakten aus verletztem Gewebe violett. In der unverletzten Kontrolle blieb die Farbreaktion auf die Zone 5 beschränkt.

4 bis 10 Tage nach Versuchsbeginn waren wiederum 8-9 Flecke mit bereits bekannten $R_f$-Werten und Farbreaktionen chromatographisch nachweisbar (Abb. 41c - Abb. 41e). Im Gegensatz zu den Extrakten aus unverletztem Gewebe verstärkte sich in allen anderen Proben aufgrund von Wundreaktionen Fluoreszenz und Anfärbung im Chlorogensäurebereich (Zonen 4-6).

Prinzipiell änderte sich auch nach 14 Tagen nichts an der typischen Verteilung im Chromatogramm (Abb. 41f). Der niedrige Chlorogensäuregehalt in Extrakten aus unverletzten Pflanzen

Tabelle 8

Charakterisierung der Phenole nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung auf Kieselgel-Platten (Fließmittel: Butanol-Eisessig-Wasser)

| Zone Nr. | Fluoreszenz im langw. UV-Licht | Farbreaktion nach Besprühen mit $Na_2CO_3$ und FCR | $R_f$-Werte (Mittelwerte aller Chromatogramme) |
|---|---|---|---|
| 10 | gelblich | - | 0,82 |
| 9 | blau violett | - | 0,75 |
| 8 | - | - | 0,61 |
| 7 | violett | - | 0,57 |
| 6 | grünlich blau | violett | 0,53 |
| 5 | hellblau | violett | 0,47 |
| 4 | grünlich blau | violett | 0,40 |
| 3 | blau violett | - | 0,31 |
| 2 | schwach violett | - | 0,15 |
| 1 | | - | 0,08 |
| S=Start | - | - | - |

Die Numerierung der Zonen erfolgte nach steigenden $R_f$-Werten

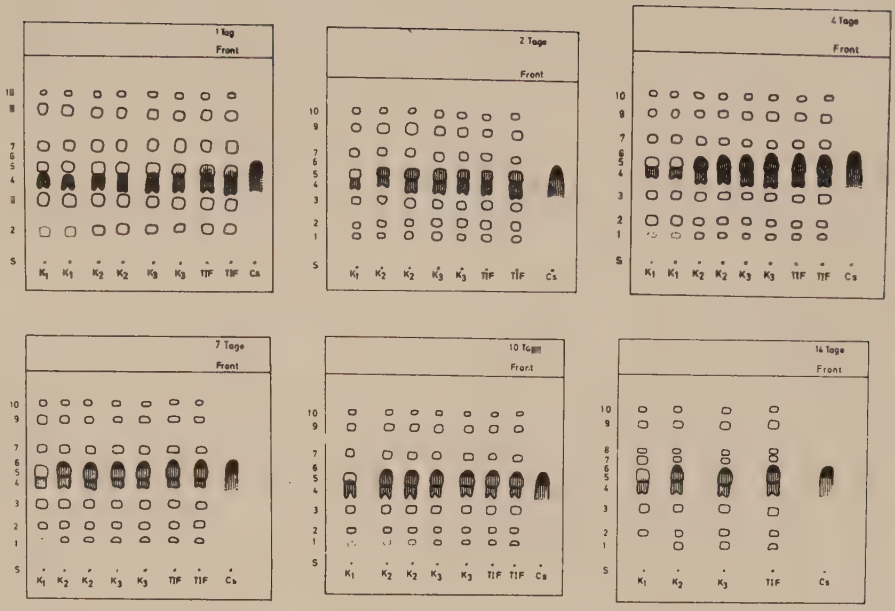



Abb. 41 a-f: Qualitativer Vergleich von Phenolextrakten aus verletzten bzw. infizierten Tabakgeweben mittels Dünnschichtchromatographie

hob sich deutlich von dem höheren in allen anderen Proben ab. Die Zone 7 war offensichtlich in sämtlichen Extrakten in 2 Banden aufgespaltet (vergl. Nr. 7 und 8).

Winzige Tumorauswüchse, die im Extrakt aus infiziertem Gewebe mitchromatographiert worden waren, führten zu keinerlei nachweisbaren Veränderungen des Phenolgehaltes.

4 Tage später (18 Tage nach Versuchsbeginn) war die Phenolverteilung im Chromatogramm (Abb. 42a) verändert. Aufgetragen worden waren Extrakte aus unverletztem ($K_1$) und verletztem Gewebe ($K_2$) sowie aus infiziertem Sproß- (Si) und Tumormaterial (T).
Die unverletzte Kontrolle wies nach wie vor nur einen geringen Chlorogensäuregehalt auf, während er im mit Puffer inokulierten Gewebe deutlich abnahm. Im Gegensatz zum Extrakt aus infiziertem Sproßgewebe mit hoher Chlorogensäurekonzentration, fehlten im Tumorgewebe die fluoreszierenden Zonen 3 und 9. Im Chlorogensäurebereich ließen sich nach FCR-Behandlung lediglich die obere und die untere Zone 4 und 6, nicht jedoch die mittlere Zone 5 anfärben.

Nach 22 Tagen (Abb. 42b) war im pufferinokulierten Gewebe der ehemals erhöhte Gehalt im Chlorogensäurebereich auf das Niveau der unverletzten Kontrolle zurückgegangen. Entsprechendes galt auch für den Phenolgehalt im infizierten Sproß.
Parallel der beendeten Wundheilung sank das Chlorogensäureniveau. Dagegen war keine Veränderung in der Anzahl der übrigen phenolischen Flecken zu beobachten. Anders waren die Verhältnisse im Tumorextrakt. Die Zone 2 war ganz schwach ausgebildet, dagegen der Chlorogensäuregehalt sehr erhöht. Wieder fand die bereits beschriebene Auftrennung in eine obere und eine untere anfärbbare Zone statt. Der mittlere Bereich reagierte nicht auf die FCR-Behandlung.

28-35 Tage nach Versuchsbeginn hatte sich diese Tendenz fortgesetzt. Deutlich hoben sich die mittleren Zonen der Tumorproben ab.
Nach 28 Tagen war ein Tumorextrakt ($T_1$) aus mehreren winzigen

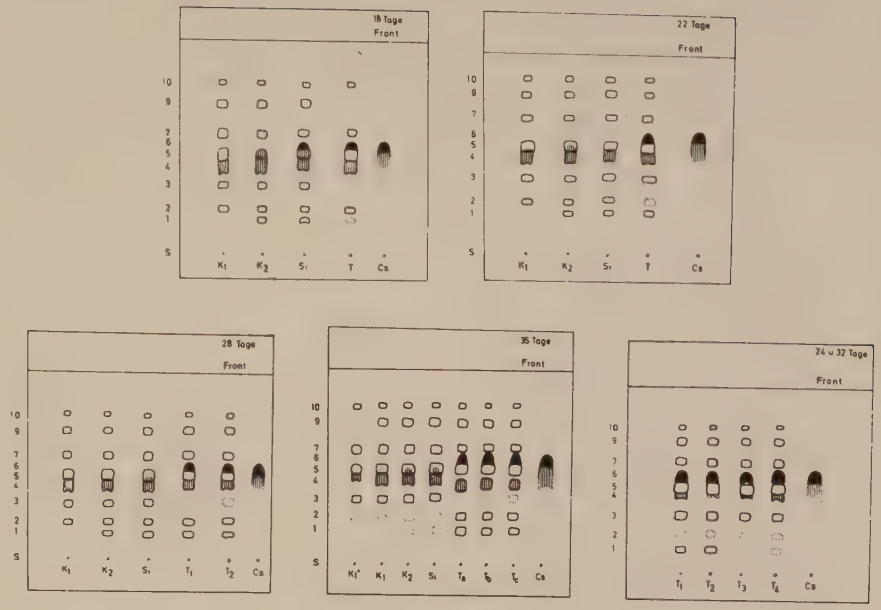



Abb. 42 a-e: Qualitativer Vergleich von Phenolextrakten aus verletzten bzw. infizierten Tabakgeweben mittels Dünnschichtchromatographie

Auswüchsen hergestellt worden, der andere ($T_2$) aus dem Teilstück eines großen Tumors. Die chromatographische Auftrennung (Abb. 42c) ergab ein vergleichbares Ergebnis. Auffallend war wieder die Teilung der Zonen im Chlorogensäurebereich in die oben und unten liegende blau-violett anfärbbaren Banden, getrennt durch den zwar fluoreszierenden, aber nicht mit FCR reagierenden Fleck.
Nach 35 Tagen stimmten die unverletzten mit den verletzten bzw. infizierten Sproßgeweben im geringen Chlorogensäuregehalt wieder überein (Abb. 42d). Der unverletzte Tabaksproß war in 2 Abschnitte, einen oberen($K_1^+$) und einen unteren ($K_1$) Sproßbereich geteilt und gesondert extrahiert worden.
Für die Tumorextraktion war ein großer Tumor in einen äußeren ($T_a$), einen mittleren ($T_b$) und einen inneren Gewebebereich ($T_c$) getrennt worden. Unterschiede im Bereich der Chlorogensäure waren jedoch nicht festzustellen.

Ein weiterer Chromatographieversuch wurde mit Extrakten aus 24 bzw. 32 Tage alten Tumoren, die teratomartige Differenzierungen entwickelt hatten, durchgeführt. Dazu wurden zuerst Serienschnitte histochemisch mit der VORSATZ/HOEPFENER Reagenz gefärbt und differenziell danach Extrakte aus einem entsprechenden, jedoch ungefärbten Teil der Serienschnitte hergestellt.

Extrakt $T_1$ bestand aus Querschnitten durch den Mittelteil des 32 Tage alten Tumors bis zu dessen Austrittsstelle aus dem Sproßgewebe. Histochemisch war in diesem Abschnitt ungefärbtes Gewebe von kirschroten Bereichen durchsetzt.
Extrakt $T_2$ entstand aus peripher gelegten Schnitten, wobei die grünen blattähnlichen Auswüchse miterfaßt worden waren. Histochemisch war wieder ungefärbtes Gewebe mit roten Zellgruppen festzustellen. Sie lagen jedoch in geringerem Ausmaße vor als in den Schnitten von Extrakt 1. Der 3. Extrakt ($T_3$) wurde aus einem mehr amorphen Tumorteil hergestellt, der einige rote Bereiche in nicht reagierendem farblosen Gewebe enthielt.
Der 4. Extrakt ($T_4$) stammte aus einem 28 Tage alten Tumor. Querschnitte durch die kompakt aussehende Neoplasie ließen sich fast vollkommen rot anfärben.
Das Chromatogramm (Abb. 42e) zeigt das Ergebnis dieser Auf-

trennung. Variationen in den phenolischen Flecken waren in der Fluoreszenzstärke der langsam wandernden Phenolverbindungen festzustellen. Chlorogensäure war in allen 4 Proben in 2 Zonen auftrennbar. Die untere der beiden Banden schien mit der Quantität der anfärbbaren Gewebeteile im histochemischen Vorgang korrelliert zu sein. Der 4. Extrakt mit der intensivsten Rotfärbung zeigte auch die größte Ausdehnung der Chlorogensäurezone.

Zusammenfassend sind die Befunde folgendermaßen zu charakterisieren: die kirschrot im Gewebe reagierenden o-Diphenol-Verbindungen waren eindeutig Chlorogensäure. Parallel zu Wundheilungsvorgängen im Gewebe und histochemischer Rotfärbung im Wundbereich stieg auch der Chlorogensäuregehalt im Extrakt an. Entsprechend fiel die Chlorogensäurekonzentration mit Beendigung der Regenerationsprozesse wieder ab. Übereinstimmung herrschte auch in der histochemischen Lokalisation der Chlorogensäure im Tumor und dem chromatographischen Befund. Wachstumsaktive Gewebe zeichneten sich durch erhöhten Chlorogensäuregehalt aus.

## 4. DISKUSSION

Die Infektion der Tabakhybriden Nicotiana glutinosa x Nicotiana clevelandii mit den beiden krebsauslösenden Prinzipien TIF und Agrobacterium tumefaciens führte zu morphologischen und histologischen Unterschieden in der Tumorbildung. Gemeinsam war beiden Systemen, daß zur Infektion als notwendiges Stimulanz zur Tumorinduktion eine Verwundung hinzukommen mußte. Die Unabdingbarkeit dieses Wundreizes ist auch von BLOCH (1941), JONES (1947), BRAUN (1952) und THERMAN (1956) für die Agrobacterium-Tumoren bestätigt worden, wohingegen dies für die Neoplasien nach Wundtumorenvirus (WTV)-Infektion und besonders die Tumorbildung infolge genetischer Inkompatibilität nicht überall gesichert ist (LITTAU & BLACK, 1952). Die Verletzung führt zur Zerstörung von Zellen, wobei freiwerdende Inhaltsstoffe der verschiedenen Zellkompartimente miteinander reagieren können. Das bedeutet den Tod dieser Zellen. Die Reaktionsprodukte wirken jedoch auch auf die unverletzten oder kaum beschädigten Zellen in Wundnähe, die dadurch veränderten Umgebungsbedingungen ausgesetzt werden, was sich wiederum auf deren Stoffwechsel auswirkt. In diesen Zellen laufen dann physiologische Prozesse ab, um die durch die Verwundung verursachte Stoffwechselstörung auszugleichen (SCHMIEDEKNECHT, 1974). Die histologisch zu beobachtende Verheilung der Wunden in den Kontrollpflanzen führte über Dedifferenzierungen der Zellen und Teilungsaktivitäten zur abschließenden Wundperiderm- oder auch Kallusbildung mit erneuten Zelldifferenzierungen. Nach TIF- und Agrobacterium-Infektionen nahm die histologische Entwicklung nach anfänglichen, den Kontrollpflanzen äußerst ähnlich sehenden Wundreaktionen einen eindeutig anderen Weg. Jedoch war keine scharfe Trennung zwischen Wundheilungsprozessen und Tumorwachstum zu ziehen. Die Wundkallusbildung ging nach Bakterieninokulation über Teilungsanomalien direkt in malignes Wachstum über. Histologisch konnte dagegen nach TIF-Infektion erst dann von Tumorbildungen geredet werden, wenn äußerlich sichtbare anomale Bildungen vorlagen. Diese Bildungen entstanden in Blattachseln und an der Sproßbasis aus Blattlücken

und -narben als blattähnliche Anlagen. Diese Entwicklung stellte an sich keine Anomalie dar, da auch die Kontrollpflanzen zu Blättchenwachstum aus diesen Stellen zu veranlassen waren. Im Gegensatz zu den nicht infizierten Pflanzen führte die TIF-Inokulation jedoch zu einer Aufhebung des sich selbst begrenzenden Wachstums, wobei gleichzeitig die Fähigkeit zur koordinierten Gewebedifferenzierung blockiert wurde, so daß anstelle von Blättern Teratome entstanden. Diese Tatsache des induzierten Teilungszwanges wird von BRAUN & STONIER (1958) als notwendig für das Tumorwachstum angesehen.
Die TIF-Teratome stellten somit anomal ausgetriebene Blattursprünge dar. Dementsprechend waren auch nur die Zellen der Blattachseln und der Blattlücken zu transformieren.
Im Gegensatz dazu wucherten nach Agrobacterium-Infektion stets amorphe Neoplasien aus allen verwundet-infizierten Pflanzenteilen der Nicotiana-Hybriden. Die von KUPILA (1958, 1963) beschriebenen Crown-gall-Tumoren an Tomate, Erbse und Sonnenblume gingen ebenfalls als amorphe Bildungen aus dem Wundgewebe hervor. BRAUN (1948, 1952, 1962) wies an Kalanchoe nach, daß auf amorphen Wucherungen sekundär organoide Differenzierungen entstehen konnten, wohingegen LEVINE (1923) über die Ausbildung von verkrüppelten Blättern und Nebensprossen aus oberen Achselknospen dekapitierter Tabakpflanzen berichtete, deren Schnittflächen mit Agrobacterium inokuliert worden waren. Teratomstruktur wiesen auch die durch den weniger virulenten Agrobacterium-Stamm T 37 an Kalanchoe hervorgerufenen Wucherungen auf (BEIDERBECK & BOPP, 1977). Die amorphen Tumoren entstanden aus allen verwundet-infizierten Geweben, soweit deren Zellen erneut teilungsfähig werden konnten, während die teratomartigen Agrobacterium-Tumoren ähnlich den TIF-Wucherungen aus Blattachseln hervorgingen (LEVINE, 1923; BEIDERBECK & BOPP, 1977).
Nach BLACK (1949, 1951, 1952) waren rundliche amorphe Strukturen typisch für die WTV-Wurzel- und -Sproßtumoren. Blattbildungen an den Sproßneoplasien wurden niemals beobachtet, wohl aber Adventivwurzelbildungen (BLACK & LEE, 1957). Am häufigsten traten nach WTV-Infektion Wurzeltumoren auf, deren Ursprung im Perizykel an der Basis einer Lateralwurzel lag,

wohingegen die Initialzellen der WTV-Sproßtumoren bevorzugt im Phloem gebildet wurden (BLACK, 1949, 1952; KELLY & BLACK, 1949; LEE, 1955a, 1956; BLACK & LEE, 1957).
Für die genetisch bedingten Sproßtumoren war wiederum die Teratomform charakteristisch (LEVINE, 1937). Der Ursprung lag zumeist an basalen Blattknospen und -narben (KOSTOFF, 1930).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten bakteriellen Wucherungen an Tabakhybriden zeigten große Übereinstimmungen im Gewebeaufbau mit den von KUPILA (1958) und KUPILA-AHVENNIEMI & THERMAN (1968) an Tomate und Erbse beschriebenen crown galls. Typisch ist für alle 3 Pflanzenarten, daß die Tumoren mit dem Sproß verwachsen und die Trennung zwischen normalem und Tumorgewebe unmöglich wird. Ebenso stimmen diese Neoplasien in ihrer Gewebeirregularität überein. Die eigenen Beobachtungen über die wirre Anordnung von Tracheiden, Phloem und kambialen Zellen im Bakterienkrebs werden von den oben genannten Autoren bestätigt. Beschreibungen der häufig in der Tumorperipherie auftretenden embryonalen Wachstumszentren finden sich auch nach SYLWESTER & COUNTRYMAN (1933) in Apfelbaumtumoren und nach JONES (1947) an Rubus. MC KEEN (1954) konnte nachweisen, daß die lignifizierten Gewebe von Agrobacterium-Tumoren an Rubus miteinander in Verbindung standen und daß Ausläufer des Sproßleitgewebes in die Neoplasien übertraten und die Nährstoffversorgung sicherstellten. Dies war auch bei den Tumoren der Nic.-Hybriden der Fall.

Eine den crown galls sehr ähnliche Histologie zeigten auch die TIF-Teratome. Das Tumorgewebe wurde über funktionstüchtige Leitelemente vom Sproß her versorgt. Insgesamt fehlte auch hier die normale Teilungs- und Differenzierungspolarität. Die peripher gelegenen meristematischen Zellkomplexe stellten Initialen für organoide Bildungen dar, die rasch nekrotisierten, wenn keine Leitzellen darin ausgebildet wurden. Diese Differenzierungen von blatt- und sproßähnlichen Gebilden bewirkte andererseits eine normaler erscheinende Gewebeanordnung als in den völlig amorphen Agrobacterium-Tumoren.

Noch regelmäßiger war der Gewebeaufbau der gentischen Tumoren, wie ihn LEVINE (1937) an Tabakhybriden beschreibt. Das parenchymatische Grundgewebe wurde von Fibrovasculargsträngen durchzogen, die, ausgehend vom Sproß, bis in die organoiden Differenzierungen hineinzogen. Nahezu identisch mit den TIF-Tumoren ist die Histologie der genetisch bedingten Teratome an Nicotiana glauca x langsdorfii wie sie KUPILA & THERMAN (1962) angeben. Anomale Tracheidbildung beschreibt KOSTOFF (1930).

Die durch WTV induzierten Tumoren hatten bei allen Pflanzenspezies gemeinsame histologische Grundzüge. Eine zentrale Masse pathologischen Xylems wird von meristematisch-parenchymatischem Gewebe mit regellos eingestreuten Phloemelementen umgeben. Zusätzlich bildeten die Sproßtumoren im peripheren Gewebe Tracheidenknäuel und Wachstumszentren aus. Das Vascularsystem von Kormus und Tumor war in der Regel miteinander verbunden (BLACK, 1945; KELLY & BLACK, 1949; LEE, 1955a).

Die in der vorliegenden Arbeit vergleichend an einer Pflanzenart untersuchten TIF- und Agrobacterium-Tumoren zeigten mehr morphologische als histologische Abweichungen. Unterschiede ergaben sich auch in den durch TIF bzw. Agrobacterium infizier- und transformierbaren Gewebetypen. KUPILA (1958) kam bei histologischer Gegenüberstellung der crown galls verschiedener Pflanzenspezies zu dem Ergebnis, daß Entwicklung und Differenzierung der Tumorgewebe primär von der Pflanzenart abhinge. Wohingegen fehlende histologische Unterschiede der WTV-Tumoren unterschiedlichster Pflanzenspezies auf eine dominierende Rolle des Erregers schließen läßt. Nach meinen Beobachtungen gehen in die Tumorausprägung sowohl der spezifische Erreger als auch die Pflanzenart ein. Die Morphologie wird eindeutig vom Erreger bestimmt. Äußerlich haben alle von KUPILA (1958) untersuchten bakteriellen Wucherungen gleiches Aussehen, während deutliche Strukturunterschiede nach TIF-, Agrobacterium- und WTV-Infektionen vorlagen. Die histologischen Gemeinsamkeiten sind zum einen wohl in gleichen Wirkmechanismen tumorauslösender Prinzipien, zum anderen auch

wesentlich in der Reaktionsmöglichkeit der infizierten Pflanzenart zu suchen. So gleichen sich histologisch TIF-Teratome an Tabak und Agrobacterium-Neoplasien an Tomate weit mehr als letztere den bakteriellen Sonnenblumenneoplasien.

Die Bereitschaft der Pflanze mit Tumorbildung auf eine Infektion zu reagieren, ist nicht sogleich nach der Verwundung optimal entwickelt. Die Empfindlichkeit für das karzinogene Agens nimmt im Verlauf der Wundheilung zu und wieder ab; d.h. die Zellen werden erst allmählich kompetent für die Transformation. So zeigte sich in den von mir durchgeführten Versuchen zur Konditionierung, daß das beste Tumorwachstum mit größter Teratommasse bei einer der TIF-Infektion vorgeschalteten Wundheilungszeit von 6 bis 12 Stunden zu erzielen war. Kürzere und längere Wundheilungszeiten vor der Infektion bewirkten vor allem quantitativ geringeres Krebswachstum. Die für eine Transformation sensitive Phase muß vor oder zu Beginn früher Mitosestadien liegen. Werden Teilungsprozesse histologisch sichtbar, hört die Transformierbarkeit der Zellen auf. Waren nämlich 72 Stunden nach Verletzung heftige Teilungsaktivitäten zu beobachten, führte eine Infektion kaum noch zu Tumorwachstum.

Vergleichbare Ergebnisse findet man in der Literatur bei Infektionsversuchen mit Agrobacterium tumefaciens. BIEBER (1967) verletzte Tomatenpflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der Infektion. Da jedoch die Wundheilungszeit mindestens 2 Tage vor Inokulation betrug, fand er maximales Tumorwachstum bei gleichzeitiger Verwundung und Infektion. BRAUN & MANDLE (1948) und LIPETZ (1965, 1966, 1967) arbeiteten mit kürzeren Wundheilungszeiten vor Infektion und beobachteten an Kalanchoe daigremontiana wiederum eine erst allmählich zunehmende Sensitivität verwundeter Zellen für die Transformation. BRAUN & MANDLE (1948) gaben als optimale Konditionierungszeit die Phase vor den ersten Zellteilungen an: bei Kalanchoe lag diese Phase 48 bis 72 Stunden nach der Verwundung, während KLEIN & LINK (1952) die optimale Induktionszeit an derselben Pflanzenart zwischen 24 und 72 Stunden nach Verletzung festlegten. LIPETZ (1965, 1966) konnte eine Korrelation zwischen

Teilungsaktivitäten und Konditionierung der Zellen nachweisen. Höhere Versuchstemperaturen führten zu früher einsetzenden Zellteilungen und parallel dazu zu einer zeitlich vorverlegten Konditionierungszeit. Auch RACK (1954) konnte beobachten, daß die Tumordisposition zeitlich von Wundheilungsprozessen begrenzt wird. Nach seinen Untersuchungen führte nur eine spätestens 4-5 Tage nach Verwundung stattfindende Agrobacterium-Infektion zur Tumorbildung. Diese Ergebnisse stimmen insofern mit den eigenen Beobachtungen überein, als einerseits die erst allmählich zunehmende Sensitivität für eine Transformation und andererseits deren Nachlassen mit beginnenden Teilungsaktivitäten bestätigt werden. Unterschiedlich sind die Angaben über die zeitliche Ausdehnung dieser Phase. Eine Erklärung für diese Diskrepanz liefern die Versuche von ANAND & HEBERLEIN (1975). Die Autoren untersuchten die Umstimmungszeiten an unterschiedlichen, bakterieninfizierten Pflanzenspezies und konstatierten, daß die Konditionierungsphase von Pflanzenart zu Pflanzenart variiert, wobei sie eher wirts- als bakterienabhängig zu sein scheint. Als Grund werden Unterschiede in der Wundheilung bzw. Zellteilungsrate angegeben.

Wenn also nach LIPETZ (1965, 1966, 1967) höhere Versuchstemperaturen zu rascherer Wundheilung und vorverlegter Transformationsbereitschaft infolge früher ablaufender Mitosen führen, dann sollte es auch möglich sein, durch Applikation von entsprechenden Wachstumsregulatoren die Zellteilungen während früher Tumorinduktionsphasen zu erhöhen und auf diesem Weg das Tumorwachstum zu beeinflussen.

Für die Auslösung von Mitosen im pflanzlichen Gewebe sind vor allem die Cytokinine verantwortlich (SACHS, 1975). BENTLEY (1961) berichtet, daß Kinetin in den ersten beiden Tagen nach Applikation die DNS-Synthese im behandelten Gewebe erhöht. So waren auch in den von mir durchgeführten Versuchen Cytokinin-Wirkungen auf Pflanzen- und Tumorwachstum zu erkennen. Die Kinetinapplikation bewirkte frühere Tumorbildung, verbunden mit erhöhter Masse und Veränderung der Tumormorphologie und war am wirkungsvollsten, wenn sie einige Zeit vor der Infektion lag. Kinetin erhöht demnach die Tei-

lungsbereitschaft der Zellen. Erfolgt dann die Inokulation, können die wundinduzierten Teilungen in den so vorbereiteten Zellen bereits zu einem früheren Zeitpunkt ablaufen, wobei dann dementsprechend auch die Konditionierungszeit vorverlegt wird. In kürzerer Zeit wird eine größere Anzahl Zellen gleichzeitig Transformations-sensitiv, was sich in rascherem und stärkerem Wachstum der Wucherungen ausdrückt. Ebenso gelang es AMES (1974), das Wachstum von genetisch bedingten Tabaktumoren und EL KHALIFA & LIPPINCOTT (1968), das von Agrobacterium-Wucherungen an Bohnenblättern durch Kinetinbehandlung deutlich zu fördern. Mit Cytokininen lassen sich zudem Seneszenzerscheinungen an Pflanzen verzögern oder rückgängig machen (KARSTEN, 1966; KENDE & SITTON, 1967). Ein derartiger Verjüngungseffekt war auch in den vorliegenden Untersuchungen zu beobachten. Alte, normalerweise nicht mehr zur Tumorbildung zu veranlassende Tabakpflanzen wurden nach Kinetinbehandlung teilweise wieder empfindlich für eine Transformation. Inwieweit dies auf eine kinetinbedingte Stoffretention und Beeinflussung der Mitoseaktivität zurückzuführen ist, läßt sich aufgrund der Versuche nicht beantworten. Die amorphere Umgestaltung der normalerweise teratomartigen TIF-Tumoren könnte ebenfalls mit der teilungssteigernden Wirkung der Cytokinine zusammenhängen. Jedoch ist stets zu beachten, daß jede Hormonbehandlung einen Eingriff in das interne Phytohormonverhältnis der Pflanze darstellt und damit in komplexe Regulationssysteme eingreift, die selbst bisher nur sehr unvollständig aufgeklärt sind. Kausalanalysen werden hierdurch sehr erschwert.

Nach den Untersuchungen von WOOD & BRAUN (1967), mußten zur Zellteilungsauslösung in Tabak-Gewebekulturen neben Cytokininen auch Indolderivate gegeben werden. Entsprechende Applikationsversuche hatten in den vorliegenden Versuchen keinen sichtbaren Einfluß auf das Tumorwachstum. Ebenso wirkte sich die Applikation von NAA allein auf das TIF-Tumorwachstum entweder hemmend oder gar nicht aus. Ähnlich erfolglos verliefen die Versuche von HILDEBRAND & RIKER (1947), die Entwicklung von Crown-gall-Tumoren durch IAA-Zugabe zu steigern. Im Gegensatz dazu gelang es BECK (1949) durch Applikation von

3%igem IAA ("Heteroauxin") auf den dekapitierten und mit Agrobacterium infizierten Sproß die resultierenden Tumoren ganz erheblich zu vergrößern. Auch KUPILA-AHVENNIEMI & THERMAN (1968) konnten die Entwicklung langsam wachsender Bakterientumoren durch IAA-Behandlung beschleunigen. BLACK & LEE (1957) gelang es, makroskopisch nicht sichtbare Tumorinitialen in mit WTV infiziertem Süßkleesproß durch 2%ige NAA-Applikation zu deutlich sichtbarem Wachstum zu stimulieren. Auxinapplikation führte nach KRAUS et al. (1936) und HAMNER & KRAUS (1937) an dekapitierten Bohnensproßen auch ohne carcinogene Infektion zu teratomähnlichem Wachstum, wohingegen BORTHWICK et al.(1937) dasselbe ohne Erfolg an dekapitierten Tomatenpflanzen versuchten. Entsprechend uneinheitlich waren auch die Ergebnisse nach Behandlung mit Gibberellinen. In der vorliegenden Arbeit hatte Gibberellinsäure, besonders wenn sie zeitlich vor TIF-Infektion appliziert wurde, deutlich hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum. In Übereinstimmung dazu verliefen die Versuche von KUPILA & THERMAN (1962), durch Behandlung von Nicotiana-Hybriden mit Gibberellinsäure die genetisch bedingten Tumoren zu stimulieren, erfolglos. Ebenso reduzierte Gibberellinsäure das autonome Zellwachstum tumorbildender Hybriden von Lycopersicon in vitro (AHUJA & DOERING, 1967) und verringert die Anzahl der in vivo entstehenden Tumoren an Nicotiana-Hybriden (AMES, 1971). Dagegen reagierten Crown-gall-Tumoren an Erbsenpflanzen mit verstärktem Wachstum auf Gibberellinsäure-Behandlung in vivo (KUPILA-AHVENNIEMI & HUHTELIN, 1974).
Das Tumorwachstum ist somit in Grenzen durch Phytohormonbehandlung beeinflußbar, wobei niemals die sichtbare Wirkung aus dem applizierten Hormon allein abgeleitet werden darf, da in nicht erkennbarem Umfang auch die internen Wachstumsregulatoren mitwirken. Dabei ist weniger der absolute Anteil eines Phytohormons ausschlaggebend, als vielmehr die relative Konzentration zueinander. So scheint native IAA im untersuchten Pflanze-Tumor-System im Optimum vorzuliegen, da zusätzliche Zufuhr eher hemmend wirkte. Dagegen läßt sich der Kinetingehalt künstlich ohne negative Folgen für Pflanze oder Tumor erhöhen. Die applizierten Hormone beeinflussen offenbar

über den Stoffwechsel der Wirtspflanzen das Tumorwachstum, was sich besonders nach Gibberellin-Behandlung zeigte: je stärker das Gibberellin-induzierte Längenwachstum der Pflanze, desto geringer das Tumorwachstum und umgekehrt. Wachstumsregulatoren können jedoch nicht die Transformation selbst beeinflussen. Bestätigung dieser Beobachtung findet sich bei EL KHALIFA & LIPPINCOTT (1968), die mit Kinetinbehandlung keine zusätzliche Tumorinduktion an mit Agrobacterium infizierten Pflanzen erzielten. Demnach ist auszuschließen, daß primär eine Phytohormonunregelmäßigkeit Ursache der Entartung ist.

Wie beschrieben, kann die Transformation nur während weniger Stunden im Wundheilungsprozess stattfinden. In dieser Zeit müssen bestimmte metabolische Reaktionen ablaufen. Diese Stoffwechselvorgänge entziehen sich histologischer Beobachtung, sie könnten jedoch mittels histochemischer Untersuchung eher erkennbar werden.
Die histochemische Lokalisierung von Peroxidase (PO) bot sich aufgrund ihrer Funktion im Wundheilungsgeschehen (VAN FLEET, 1952) und in der Phytohormonregulation (CURTIS, 1971) an.
In der vorliegenden Arbeit wurde die Färbemethode nach VAN DUIJN (1955) mit Benzidin als Peroxidase-Substrat verwendet. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß sie nur für histologische Untersuchungen geeignet ist. Die sich bildenden Benzidin-blau-Kristallnadeln machen eine feinere cytochemische PO-Lokalisierung unmöglich. Auf diesen Mangel hatte VAN DUIJN bereits selbst hingewiesen. EDTA, bekannt als Inhibitor für PO, wirkt bei dieser Färbung als Stabilisator für den blau gefärbten Benzidinkomplex. EDTA inhibierte PO nur dann, wenn das Gewebe vor der Anfärbung in einer höher konzentrierten EDTA-Lösung vorbehandelt wurde (VAN FLEET, 1959). Ein weiterer Kritikpunkt der verwendeten Methode liegt darin, daß Färbung nur dort eintreten kann, wo sich Kristallisationskerne befinden. Dabei können sich Enzymlokalisation und Reaktionsort verschieben (VAN DUIJN, 1955). Als Vorteil ist andererseits anzusehen, daß das oxidierte Benzidin unlöslich wird und damit nicht mehr in die Zellen einzudringen vermag. Artefakt-

bildung durch nachträgliches Diffundieren aus der Lösung in die Zellen wird dadurch vermieden. STRAUS (1964) setzte sich sehr kritisch mit den Benzidinfärbungen an tierischem Gewebe auseinander. Er beobachtete, daß die Benzidinkristallisation mit sinkendem pH-Wert zunahm. Das pH-Optimum von PO liegt bei 5,5. Für die Hitzeinaktivierungen war jedoch ein pH-Wert von 4,5 vorteilhafter. So mußte ich den Nachteil der stärkeren Kristallisation in Kauf nehmen, wobei andererseits die Blaufärbung wiederum stabiler wurde. Um die Verklumpung der Kristalle zu vermeiden, schlug STRAUS (1964) vor, die Inkubationszeit möglichst gering zu halten. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterial wurden die Schnitte jedoch dann nicht gleichmäßig angefärbt. Eine Verbesserung der Methode war durch mehrmalige kurzzeitige Inkubation der Schnitte in jeweils erneuertem Färbemedium zu erreichen. Der bei unfixiertem Material auftretende Aktivitätsverlust ins Medium (HALL & SEXTON, 1972) war durch leicht fixierenden Äthanol-Acetat-Puffer ohne sichtbare Minderung der PO-Aktivität im Gewebe zu verringern. Zu hohe $H_2O_2$-Konzentrationen führen nach STRAUS (1964) zu verstärkter Kristallbildung. Die im vorliegenden Fall verwendete ca. 0,03%ige $H_2O_2$-Konzentration entspricht der von STRAUS vorgeschlagenen. Trotz der aufgeführten Nachteile ist diese histochemische PO-Färbung nach VAN DUIJN und auch nach STRAUS eine der am leichtesten durchzuführenden und verläßlichsten Methoden.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten hitzestabilen Peroxidase-Isoenzyme stimmten trotz unterschiedlicher Methoden und Pflanzenmaterial recht gut mit den in der Literatur angegebenen Lokalisierungen von Peroxidase überein. Dadurch war weitgehend auszuschließen, daß es sich bei den sog. hitzestabilen Isoenzymen um Artefakte handeln könnte. Die gleichbleibend starke Peroxidase-Aktivität in Phloem und Endodermis wurde von VAN FLEET (1952) an verschiedenen, nicht verwandten Pflanzenarten bestätigt. Nach ihm ist die Präsenz von Peroxidase im Phloem ein für dieses Gewebe charakteristisches Leitenzym. Zeitweilig waren in den Nicotiana-Hybriden Enzymaktivitäten in Epidermis, jungen Xylemzellen, Abzissionszonen und

in Blattknospen umgebenden Geweben zu beobachten. Ähnliche Angaben finden sich bei VAN FLEET (1952, 1959), KOBLITZ (1961) und HENRY et al. (1974). Peroxidase ist im Wundheilungsgeschehen eines der am frühesten aktivierten Enzyme. Spätestens am 2. Tag nach Verwundung bzw. Infektion traten in den intakt gebliebenen Zellen wundinduzierte Isoenzyme auf. Diese derart sichtbar zu machende Enzymaktivierung und -differenzierung geht den anatomischen Differenzierungszeichen voraus und ist ein früher Indikator veränderter Stoffwechselregulation.
Die Aktivität hörte mit frühen Teilungsstadien auf, eine Beobachtung, die auch VAN FLEET (1959) machte.
Die wundinduzierte Peroxidase-Aktivierung ist auch in den Zymogrammen zu erkennen. Zwischen dem 2. und 9. Tag fand eine deutliche Aktivitätssteigerung der hitzestabilen Isoenzyme statt. Im kathodischen Bereich wurde die Zone 4' zusätzlich aktiv, im anodischen Bereich wurde eine Zone 2 sichtbar, die der unerhitzten Kontrolle fehlte, möglicherweise aber eine Verschiebung der Zone 3 darstellte. Entsprechend der zu Ende gehenden Wundheilung sank nach 21 Tagen gleichfalls die Enzymaktivität. Die gleiche Tendenz war auch in den Zymogrammen der unerhitzten Kontrollextrakte zu erkennen. Daraus wird ersichtlich, daß die im Gewebeschnitt "neu" erscheinenden Isoenzyme nicht auf einer Neusynthese oder -aktivierung beruhen, sondern lediglich eine Aktivtätserhöhung vorhandener Isoenzyme darstellen. Der junge Tumor, 21 Tage nach Versuchsbeginn, besaß eine im Vergleich zum Sproßgewebe leicht erhöhte Enzymaktivität. Qualtitativ entsprach das Isoenzymmuster dem des Sproßgewebes 2 Tage nach Versuchsbeginn. Im Gewebeschnitt waren vor allem Zellen, die frühe Differenzierungsstadien durchliefen, anfärbbar. Mit fortschreitender Tumorentwicklung differenzierten sich zunehmend Vaskularelemente, begleitet von Lignifizierungen, was sich in weiterer Enzymerhöhung ausdrückte. Das Enzymmuster veränderte sich dagegen qualitativ nicht nennenswert.
Diese Beobachtungen stimmen grundsätzlich mit den Peroxidase-Untersuchungen von WEGEN (1979) an denselben Versuchspflanzen überein. Auch WEGEN stellte keine qualitativen Veränderungen der Zymogramme von Peroxidase bei den Puffer-inokulierten und

mit TIF infizierten Proben fest. So kann für dieses System ausgeschlossen werden, daß Änderungen im Isoenzymmuster eine wesentliche Rolle in der Regulation des Stoffwechsels der tumorbildenden Pflanze spielen. In den Tumorextrakten waren den Sproßgeweben entsprechende Isoenzyme vorhanden; neue, TIF-induzierte Isoenzyme waren nicht nachweisbar. Entsprechend ließen die Tumorgewebe auch ein eigenes Peroxidase-Aktivitätsmuster vermissen. Die Zellen des Tumors reagierten sowohl zell- als auch entwicklungstypisch wie die des normalen Sproßgewebes. Das bestätigte die histologisch begründete Aussage, wonach sich der Tumor nur aus normalerweise auch in der Wirtspflanze vorkommenden Zelltypen zusammensetzt. Infolge rudimentärer Determinationsfähigkeiten entgleist jedoch das gewebliche Differenzierungsmuster, ohne Einfluß auf die Enzymaktivität auszuüben. CURTIS (1971) fand dagegen in mit Agrobacterium tumefaciens infizierten Phaseolus-Blättern sowohl erhöhte Peroxidase-Aktivität als auch 2 zusätzliche, auf die Wirkung des Bakteriums zurückführbare Isoenzyme. Der Autor ließ selbst jedoch offen, ob die beiden neuen Isoenzyme im gesunden Gewebe infolge zu geringer Quantität nicht nachzuweisen waren. Ebenso beobachteten GORDON (1968) in den ersten Tagen nach Verwundung in Tomatenpflanzen 2 neue wundinduzierte Isoenzyme und OCKERSE & HUMFORD (1973) dasselbe an Erbsensproßstücken. BIRECKA et al. (1975) konnten dagegen in Tabakgewebekultur keine qualitativen Veränderungen des Peroxidase-Isoenzymmusters nach Verwundung nachweisen.

Aus unerhitztem Pflanzenmaterial waren in meinen Versuchen max. 14 Peroxidase-Isoenzyme zu extrahieren. WEGEN (1979) fand in denselben Versuchspflanzen 14 bis 16 Isoenzyme. Die Differenz dürfte an der abgewandelten Methodik liegen. Entsprechende Ergebnisse finden sich bei MÄDER et al. (1975, 1976). In Rohextrakten aus Normal-, Kallus- und Tumorgeweben von Nicotiana tabacum konnten die Autoren 15 Isoenzyme gelelektrophoretisch trennen. Die Isoenzyme teilten sich aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten in 4 Gruppen, je eine anodische und eine kathodische mit höherer und niederer Mobilität.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung bei 58° C schaltete im Gewebe einige Isoenzyme aus, die nach elektrophoretischer Auftrennung den rascher wandernden kathodisch und anodischen Gruppen zuzurechnen sind. Die langsam wandernden Gruppen ließen sich in einzelne Isoenzyme auftrennen, wohingegen in den beiden Gruppen höherer Mobilität in einigen Zymogrammen eine undifferenzierte PO-Aktivität in Form einer "Schulter" auftrat. GORDON (1968) und GORDON & ALLDRIDGE (1971) vermochten nur die lösliche Fraktion der hitzestabilen Isoenzyme in einzelnen Zonen aufzuspalten, die zellwandgebundene Fraktion lief vom Startpunkt in einer Schmiere aus. Die Autoren machten dafür Konzentrationsverhältnisse und veränderte Proteine verantwortlich. Auch im vorliegenden Fall liegt wahrscheinlich der Grund für diese "Schulter" in labilen Proteinstrukturen, wobei die Wärmebehandlung und der anschliessende Extraktionsvorgang die Enzyme beeinflußt haben können. Möglicherweise hatte aber auch die Erhöhung des pH-Wertes und die lange Laufzeit der Elektrophorese zu einer leichten Reaktivierung geführt. Da in allen Versuchen die Isoenzyme der langsam wandernden Gruppen recht konstant blieben, andererseits die undifferenzierte Peroxidase-Aktivität relativ gering war, wurde diese als Artefaktbildung vernachlässigt.

Die Auftrennung des Enzymextraktes in eine lösliche (im Cytoplasma und Zellwandbereich ungebunden diffundierende), in eine ionisch und eine kovalent in die Zellwand gebundene Fraktion zeigte, daß alle Isoenzyme in der ungebundenen Form auftreten können. Nach dem Zymogramm waren umgekehrt auch fast alle Isoenzyme ionisch in die Zellwand einlagerbar. Die kovalent inkorporierten Isoenzyme gehörten ausschließlich der schnell wandernden anodischen Gruppe an.

Die Untersuchungen von MÄDER (1974) und MÄDER et al. (1975) an unterschiedlichen Geweben von Nicotiana tabacum stimmen insofern mit den eigenen Befunden überein, als auch in dieser Tabakart alle vorkommenden Isoenzyme im Zellwandbereich lokalisiert sein können. Protoplasten-Peroxidase war nach den Autoren der kathodischen Gruppe mit geringer Mobilität zuzurechnen, wohingegen BIRECKA & MILLER (1974) entsprechende

Isoenzyme von Tabakmarkgewebe in die anodische und kathodische Gruppe hoher Mobilität einordneten. MINOCHA & HALPERIN (1976) fanden bei der Untersuchung von löslichen, ionisch und kovalent gebundenen Peroxidasen aus Helianthus-Gewebekultur, daß die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen je nach Kulturbedingungen stark variieren konnten. Wegen dieser Labilität ist es unmöglich, bei unterschiedlichen Versuchsparametern absolute Aussagen über ein Enzym zu machen.

Als thermoresistent erwiesen sich im vorliegenden Fall lösliche und ionisch gebundene Isoenzyme, die auch in situ als cytoplasmatisch- und Zellwand-gebundene PO anfärbbar waren. Kovalent gebundene Peroxidase war histochemisch nicht zu differenzieren und aufgrund der verwendeten Methoden auch nicht im Extrakt nachzuweisen. GORDON & ALLDRIDGE (1971) zeigten, daß die Hitzestabilität im Gewebe höher lag als im Extrakt. Die Autoren geben als mögliche Gründe dafür die Bindung an plasmatische Organelle und Zellwandbestandteile in intakten Zellkompartimenten an, die die Isoenzyme vor negativen Effektoren schützt.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von DE JONG (1967) an Allium und ARNISON & BOLL (1976 a, b) an Phaseolus-Gewebekultur wird Peroxidase im Cytoplasma synthetisiert und successive in die Zellwand eingelagert. Da diese Peroxidase nach RIDGE & OSBORNE (1970) einen Teil der Zellwand-Proteine ausmacht, wiesen demnach unterschiedliche Enzymmuster auf verschiedenen Aufbau und Funktion der Zellwand hin. Darauf wird später noch näher eingegangen. Inwieweit bei der Anfertigung der Gewebeschnitte lösliche Peroxidase sekundär in die Zellwand gebunden wurde, war nicht zu erkennen, muß jedoch bedacht werden.

Peroxidase ist nach SRIVASTAVA & VAN HUYSTEE (1977) ein Enzymkomplex, der je nach Substrat auch IAA-Oxidase- und Polyphenoloxidase-Funktion ausübt. WEGEN (1979) wies diese 3 Funktionen auch für die Peroxidase von Nicotiana clevelandii x Nicotiana glutinosa nach.
IAA-Oxidase war in der vorliegenden Arbeit aufgrund nicht ab-

zutrennender phenolischer Substanzen histochemisch nicht nachweisbar. Polyphenoloxidase-Aktivität zeigte sich in Endodermis und in wachstumsaktiven Zonen im Tabakspro ß sowie in erhöhter Konzentration im Tumor. Entsprechende Lokalisierungen in anderen Pflanzenarten werden auch von VAN FLEET (1959) beschrieben. Polyphenoloxidase wurde vor Peroxidase im Gewebe aktiv. WESTSTEIJN (1976) fand in jüngeren Tabakblättern mehr Polyphenoloxidase-, in älteren mehr PO-Aktivität. Polyphenoloxidase war hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert und erwies sich als nicht thermostabil. Damit war bewiesen, daß den beobachteten Isoenzymen ausschließlich allgemeine Peroxidase-Funktion zukam.

Veränderungen im o-Diphenolgehalt deuteten ebenfalls eine Beteiligung des Phenolstoffwechsels an Wundheilung und Tumorwachstum an. Aufgrund histochemischer und chromatographischer Untersuchungen konnten zwischen typischen Wundheilungsreaktionen und Tumorgenese unterschieden werden. Die o-Diphenolgehalte der verwundeten und infizierten Gewebe stiegen bereits 1-2 Tage nach der Inokulation über das Niveau der Kontrollpflanzen. Der intensivierte Phenolstoffwechsel war histologisch durch die anfärbbaren o-Diphenole im Wundbereich und chromatographisch als Konzentrationserhöhung speziell der Chlorogensäure nachweisbar. Solange die Wundregeneration andauerte, konnte kein Unterschied zwischen den mit Puffer, mit Pflanzenpreßsaft und mit TIF inokulierten Geweben beobachtet werden. Erst mit Abklingen der Heilungsprozesse (nach ca. 18 Tagen) sank im verletzten Sproß der Chlorogensäuregehalt, während er im infizierten Gewebe weiterhin erhöht blieb. Diese Wirkung beruhte möglicherweise auf einer Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber dem TIF. Entsprechende Wund- und Abwehrreaktionen der Pflanzen finden sich auch in der Literatur. TANAKA & URITANI (1977) konnten ebenfalls o-Diphenole im Wundgewebe verletzter Süßkartoffelwurzeln nachweisen. JANAS (1977) fand o-Diphenole in durch Meloidogyne infiziertem und beschädigtem Gewebe. Dieselbe Phenolgruppe war in nekrotischen Flecken von Alternaria-infizierten Sonnenblumenblättern erhöht. In mit Agrobacterium tumefaciens

infizierten Geweben wiesen SPURR et al. (1965) 5 Tage nach Inokulation gegenüber den verwundeten Kontrollen einen deutlich erhöhten Chlorogensäuregehalt nach, der auch im Crown-gall-Tumor erhalten blieb. Diese Feststellung trifft ebenfalls für die eigenen Untersuchungen am TIF-infizierten Tumor zu. Der erhöhte Gehalt an Chlorogensäuren blieb während des Untersuchungszeitraumes erhalten. SHEEN & ANDERSON (1974) fanden in genetisch bedingten Nicotiana-Tumoren einen zu normalem Gewebe vergleichsweise stark intensivierten Chlorogensäurestoffwechsel, der mit zunehmendem Alter sich erhöhte. In der vorliegenden Untersuchung war der Chlorogensäuregehalt weniger vom Tumoralter als vom Entwicklungszustand abhängig. Solange die Tumorentwicklung progressiv war, blieb auch der Chlorogensäurespiegel hoch, was einerseits auf Wachstumsregulation, andererseits auf eine Rolle in Differenzierungsvorgängen hinweist. Die quantitative Bestimmung der Phenole in situ lassen sich gut mit den qualitativen Analysen des Phenolextraktes vergleichen. Im Verlauf der Wundheilung und Tumorentwicklung änderte sich sowohl der Gesamtphenolgehalt als auch die in diesem Zusammenhang allein interessierende Chlorogensäurekonzentration. Ab dem 4-Tage-Stadium war Chlorogensäure als Zone 6 deutlich in verwundetem und infiziertem Gewebe nachweisbar. Da bei der Chromatographie synthetischer Chlorogensäure als Vergleichssubstanz stets Schwanzbildung zu beobachten war, die bis zu den Zonen 5 und 4 reichte, ist zu vermuten, daß es sich dabei um weitere Chlorogensäureverbindungen handeln könnte. Chlorogensäure ist der Hauptphenolbestandteil im Tabak (VAN LOON, 1971). ZENK & MÜLLER (1963) fanden in allen grünen Organen von Nicotiana tabacum 3 verschiedene Isochlorogensäuren. So wäre nach dem Chromatogramm der synthetischen Chlorogensäure(n) die Zone 4, die in allen Chromatogrammen nachweisbar blieb, ebenfalls eine Chlorogensäure. Erst nach Verwundung traten die Zonen 5 und 6 auf, die mit Abschluß der Wundheilung auch wieder verschwanden. TANAKA & URITANI (1977) wiesen die im Wundgewebe von Süßkartoffeln histochemisch anfärbbaren o-Diphenole als Chlorogen- und Isochlorogensäure nach. Die gleichen Phenolverbindungen fand JANAS (1977) in mit Meloidogyne infiziertem Möhren-

gewebe.
Solange zur Tumorentwicklung noch Regenerationsprozesse hinzukamen, erstreckte sich der Chlorogensäureanteil über 3 Zonen (4-6). Im reinen Tumorextrakt fehlte dagegen stets Zone 5. So war in den Phenolkomponenten ein qualitativer Unterschied zwischen Wundheilungsvorgängen und Tumorgenese vorhanden, der differierende Stoffwechselregulationen andeutet.

Die Folgerungen, die sich aus dem Zusammenwirken von Phytohormonen, Oxidasen und Phenolen für die TIF-induzierte Tumorgenese ergeben, sollen im folgenden zusammenfassend erörtert werden.
Das Tumorwachstum ist in besonderem Maße ein Problem der Hormonregulation. In der gesunden Pflanze ist eine Hormonrelation vorhanden, die sich gemäß der Pflanzenentwicklung in vorgegebener Weise ändert, zu jedem Zeitpunkt jedoch in sich nach den Erfordernissen ausgewogen ist. TIF-Tumoren entwickeln sich von verwundet-infiziertem Gewebe. Die Wundheilung führt zu einer Derepression von Genen, die den Hormonmetabolismus umregulieren (KUPILA-AHVENNIEMI & THERMAN, 1968) und eine zusätzliche Hormonsynthese veranlassen (KUPILA & THERMAN, 1962). Nach BENAYOUN et al. (1975) sorgen im Phloem transportierte auxinhaltige Stimuli für eine Neusynthese zerstörter Vascularelemente. Das Ausmaß des vorhandenen Phloems bestimmt, wieviel Auxin transportiert und Xylem regeneriert wird. Mit Verwundung und Zellysis geht eine Aktivierung von Polyphenoloxidase und Phenolsynthese einher. Nach PILET (1964) und MATTA & GENTILE (1968) ist eine IAA-Synthese folgendermaßen möglich: aus Phenolen (z.B. Chlorogensäure) entstehen durch Polyphenoloxidase Quinone, die dann mit Tryptophan zusammen zu IAA umgewandelt werden. Derartige wundinduzierte IAA könnte Kalluswachstum veranlassen, womit die Postulierung eines eigenen Wundhormons entfiele. Möglicherweise spielt dabei die im Phloem nachweisbare Peroxidase eine Rolle. Nach VAN FLEET (1959) verbindet diese Peroxidase ausdifferenziertes Gewebe mit Primordien und scheint notwendig für die Initiierung und Zellteilung dieser Primordien zu sein. Auf der Basis ablaufender Wundheilungsprozesse entwickelt sich durch progressiven

Fortfall der physiologischen Wachstumsregulation infolge TIF-Transformation das Tumorwachstum. Die wundinduzierte Hormonsynthese wird der Wirtskontrolle entzogen und verläuft in der Folge ungeregelt und autonom weiter. IAA-Autonomie ist für TIF-Tumoren von MISRA & NIENHAUS (1976), für Crown-gall-Tumoren von BOUILLENNE & GASPAR (1970) und für genetisch bedingte Tumoren von BAYER (1977) nachgewiesen. Der junge Tumor stellt somit ein auxinproduzierendes Wachstumszentrum dar, dem jedoch eine Wachstumsachse fehlt. Differenzierungen treten auf, wenn die Auxinsynthese nachläßt bzw. das Auxinniveau sinkt. Die in den Tumorzellen erhöhte Konzentration an IAA und IAA-ähnlichen Stoffen kommt entweder durch Steigerung der Synthese und/oder durch verminderten Abbau zustande. HENDERSON & BONNER (1952) fanden in Agrobacterium-Tumoren eine verstärkte IAA-Syntheserate, wobei wieder Tryptophan als möglicher IAA-Precursor angenommen wird und Polyphenoloxidase in Gegenwart von Chlorogensäure die Synthese reguliert (GORDON & PALEG, 1961). WEGEN (1979) vermutet diesen Auxinsyntheseweg auch für die TIF-Tumorzellen. Andererseits kann die Phenoloxidase bei der Degradierung der IAA durch Bildung eines IAA-Chinon-Kondensationsproduktes mitwirken (LEOPOLD & PLUMMER, 1961; SEQUEIRA, 1963). Der IAA-Spiegel wird vermutlich primär durch PO- bzw. IAA-oxidase-Aktivität reguliert (ANDRAE & ANDRAE, 1953). Nach WEGEN (1979) ist zum Zeitpunkt der Tumorentstehung die Aktivität der IAA-oxidase reduziert. Geringerer IAA-Abbau infolge verminderter Oxidase-Tätigkeit könnte mit das gesteigerte Wachstum des Tumorgewebes erklären. BOUILLENNE & GASPAR (1970) fanden in Crown-gall-Gewebe einen erhöhten Gehalt an IAA-oxidase-Inhibitoren. Nach FRIČ (1974) geht ein Absinken der IAA-oxidase mit einer Akkumulation von Phenolen während einer Mehltau-Infektion der Gerste einher. So kann auch der von WEGEN (1979) nachgewiesene erhöhte Gehalt an o-Diphenolen bei den Wachstumsvorgängen während der Tumorgenese in Zusammenhang mit der Regulierung des IAA-Abbaus stehen. Die o-Diphenole als IAA-Protektorsubstanzen inhibieren die IAA-oxidase-Aktiviät und tragen so zu einer Ansammlung auxinartiger Wuchsstoffe bei, resultierend in verstärktem Wachstum. Dabei

wird besonders der Chlorogensäure eine IAA-oxidase-hemmende Wirkung zugesprochen (SRIVASTAVA & VAN HUYSTEE, 1977). JORDAN & FEUCHT (1977) wiesen in einer rasch wachsenden Prunusgewebekultur einen hohen und in der kaum wachsenden einer anderen Prunussorte einen entsprechend niedrigeren Chlorogensäuregehalt nach. Erhöhte Chlorogensäuresynthese in situ fanden SHEEN & ANDERSON (1974) in genetischen Tabaktumoren und machten dies für den erhöhten IAA-Gehalt des Gewebes verantwortlich. Auch im eigenen Untersuchungsobjekt gibt es deutliche Unterschiede im Chlorogensäuregehalt zwischen Tumor und Sproß. Das vermehrte Auftreten dieser Verbindung im Tumor macht eine stärkere Inhibierung der IAA-oxidase in diesen Zellen wahrscheinlich.
IAA-oxidase ist ein adaptiv gebildetes Enzym. Mit Altern des Gewebes erhöht sich die IAA-oxidase-Aktivität, die erst aufgrund endogener IAA-Erhöhung nach einer lag-Phase induziert wird (GALSTON & DALBERG, 1954; PILET & GALSTON, 1955; WEGEN, 1979). Somit können auch im Tumorgewebe Differenzierungsvorgänge ablaufen. Während im gesunden Gewebe die einzelnen Wachstumszentren sich gegenseitig beeinflussen, fällt diese Regulation im transformierten Gewebe weitgehend fort. Hierbei dürfte es sich u.a. auch um eine veränderte Reaktion der Tumorzellen auf Hormoneinwirkungen handeln, die aufgrund veränderter Membraneigenschaften zustande kommt (WOOD & BRAUN, 1961; BRAUN & WOOD, 1962). Die im Tumor produzierte IAA wirkt auf benachbarte Zellen ein und veranlaßt Differenzierung und Lignifizierung durch Induktion eines Peroxidasesystems (GALSTON & DAVIES, 1969). Diese Peroxidase wird im Cytoplasma aktiviert und entfaltet ihre Wirkung bei Einlagerung in die Zellwände. Die Rolle der Peroxidase bei der Ligninsynthese ist nach eigenen histochemischen Beobachtungen wahrscheinlich. Sie wird auch von KOBLITZ (1961), HALL & SEXTON (1972), HEPLER et al. (1972), HARKIN & OBST (1973), RAA (1973) und MÄDER (1974) angegeben. MINOCHA & HALPERIN (1976) konnten eine Polymerisation von Ligninvorstufen unter Einfluß von Peroxidase-Aktivität in Sekundärwänden von Helianthus-Gewebekultur nachweisen, während MÄDER et al. (1976) in Abhängigkeit von Kallusdifferenzierung zwar Peroxidase-

Veränderungen aufzeigen, jedoch keine Verbindung zwischen Peroxidase-Aktivität und Zellwandsynthese erkennen konnten. So gelang es bisher, weder bestimmte Isoenzyme dafür verantwortlich zu machen, noch den Nachweis für die Allgemeingültigkeit dieser Peroxidase-Funktion zu führen. Jedoch lassen die in vitro-Versuche zur Substratspezifität der Peroxidase eine Beziehung zum Phenolstoffwechsel erkennen (SIEGEL & GALSTON, 1967), der auch für die Gerbstoffbildung wichtig ist.

Da im Tumor mehrere Wachstumszentren gleichzeitig wirken, führt dies zu einer verzerrten Gefäßdifferenzierung. Je mehr IAA wirkt, desto stärker ist die Xylembildung und damit auch die Verholzung. Dementsprechend kann für die Crown-gall-Tumoren ein höherer Auxin-Gehalt angenommen werden als für die TIF-Tumoren.

Neben Auxin spielen die Cytokinine im normalen Hormonstoffwechsel eine wichtige Rolle. Cytokinine fördern die Initiierung neuer Vegetationspunkte. Die im normalen Sproß vorliegende Dominanz eines oder weniger Wachstumszentren wird durch eine kontrollierte Cytokininsynthese aufrechterhalten. Unregulierte, überhöhte Cytokininproduktion, wie sie für Crown-gall-Gewebe nachgewiesen ist, führt zur Bildung zahlreicher Wachstumszentren, wobei keines erkennbar dominiert. Für die TIF-Tumoren ist zwar Cytokininautonomie nachgewiesen (MISRA & NIENHAUS, 1976), jedoch liegen keine Daten über die Quantität dieses Phytohormons im Tumor vor.

Die Tumorgewebe stellen keine Aggregation völlig unabhängig voneinander wachsender Zellen dar, sondern es findet durchaus eine korrelative Differenzierung statt. Derartige rudimentäre Differenzierungs- und Organisationsfähigkeiten äußern sich bei den TIF-Teratomen in der Organoidbildung. Innerhalb dieser organähnlichen Strukturen können recht regelmäßig aussehende Leitbahnen entstehen. Nach KUPILA (1963) kommen Unterschiede in der Tumorstruktur auch durch unterschiedliche Hormonsynthesen und -leitungen zustande. Bei Crown-gall-Tumoren werden nach KUPILA die Organoidbildungen durch ein Übermaß an Auxinen unterdrückt. Die Teratomstruktur genetisch bedingter Tumoren kommt nach KUPILA &

THERMAN (1962) folgendermaßen zustande: das rudimentäre Leitgewebe kann keinen kontinuierlichen Hormontransport leisten. Von den randlichen Wachstumszentren werden reichlich Indolderivate geliefert, die im Tumorzentrum akkumulieren und hier die Desorganisation noch verstärken. Ein im Vergleich zu Crown-gall niedrigeres IAA-Niveau läßt die Tumor-Cytokinine dagegen in der Peripherie mehr zur Wirkung kommen, womit auch das Wachstum der organoiden Strukturen zu erklären ist. Dieses Modell läßt sich im Hinblick auf die Hormonverhältnisse ohne Einschränkung auch auf die TIF-Teratome übertragen. Zudem sind danach die morphologischen Veränderungen nach Kinetinbehandlung zu erklären. Kinetin induzierte weitere Wachstumszentren, die ihrerseits verstärkt Auxin produzierten, was zu einer Unterdrückung der Cytokininwirkungen und damit zu amorpherem Wachstum führte. Nach KULL (1972) fördern Cytokinine zudem die Phenol-, u.a. auch die Chlorogensäurebildung, die über Inhibierung der IAA-oxidase den IAA-spiegel positiv beeinflußt. Die Unwirksamkeit von appliziertem NAA läßt sich mit einem bereits überoptimalen Auxingehalt im Tumor erklären. HILDEBRAND & RIKER (1947) gelang es aus demselben Grund, durch IAA-Behandlung keine Steigerung des Crown-gall-Wachstums zu erzielen.

Die Entwicklung des sekundären Vascularsystems wird außer durch IAA auch durch Gibberellinsäure beeinflußt. Dieser Wachstumsregulator ist besonders für die Phloemdifferenzierung notwendig (GALSTON & DAVIES, 1969). Tumorgewebe sind zwar Gibberellin-autotroph, Untersuchungen über das endogene Niveau fehlen aber bisher. Manche physiologische Wirkung der Gibberellinsäure wird über eine Erhöhung des Auxinspiegels verursacht (KULL, 1972). Das Hormon schützt die IAA vor der abbauenden IAA-oxidase und übt somit eine den o-Diphenolen entsprechende Wirkung auf das Auxinniveau aus.

In zwergwüchsigen Pflanzen mit erhöhter PO bzw. IAA-oxidase-Aktivität (SINGH & SINGH, 1974) erniedrigt Gibberellinsäure-Applikation somit den wachstumshemmenden Oxidaseeinfluß.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Gibberellin-Applikation hatte starkes Pflanzen- und reduziertes Tumorwachstum zur Folge. Die verwendeten Nicotiana-Hybriden sind infolge Kurztagsbedingungen rosettenwüchsig, was nach GALSTON & DAVIES (1969) auf eine unteroptimale Gibberellinsynthese hinweist. Die Behandlung hatte demnach das endogene Defizit ausgeglichen. Das resultierende geringe Tumorwachstum beruht wahrscheinlich einerseits auf dem gesteigerten Nährstoffbedarf der wachsenden Wirtspflanze, die damit dem Tumor die Wachstumsmöglichkeit entzieht; andererseits erhöht Gibberellinsäure die Apikaldominanz (AMES, 1974) und verhindert so z.T. das Austreiben von transformiertem Knospengewebe. Unberücksichtigt blieben in dieser Untersuchung die Wachstumsregulatoren Abszissinsäure und Äthylen.

Auslösemechanismus genetisch bedingter Tumoren ist ein endogener Auxinabfall (AMES, 1970, 1974; LIU et al., 1978). Basale Knospen, die nicht mehr unter Apikaldominanz stehen, treiben als teratogene Strukturen aus. Für den vorliegenden Fall ist eine Tumorbildung aufgrund genetischer Inkompatibilität auszuschließen, obgleich es in Morphologie, Histologie und Entstehungsort Ähnlichkeiten gibt. KORNAU (1978) vermutet, daß der TIF Corynebacterium fascians ist. Dieses Bacterium vermag Wirts-IAA abzubauen. In Zusammenspiel mit bakterieneigenen Cytokininen treiben basale Knospen in anomaler Weise aus. Die eigenen Untersuchungen unterstützen somit KORNAUs Vermutungen. Diese Wachstumsanomalien sind allerdings bisher nur als Gallen in der Literatur beschrieben worden. Da jedoch für die TIF-Wucherungen Wuchsstoffautonomie nachgewiesen ist, kann diese Frage nicht endgültig geklärt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Vergleichende histologische Untersuchungen wurden an Sproßquerschnitten von Nicotiana-Hybriden durchgeführt, die mit einem tumorinduzierenden Faktor (TIF) und mit Agrobacterium tumefaciens infiziert worden waren. In mit TIF infiziertem Sproßgewebe entwickelten sich innerhalb von 14 Tagen charakteristische Teratome aus Blattlücken und Blattachseln. Die mit Agrobacterium infizierten Pflanzen bildeten nach 7 Tagen amorphe Neoplasien aus allen inokulierten Geweben. Beide Tumorarten zeigten weitgehend übereinstimmende histologische Merkmale.

Stets war zur Tumorinduktion eine Verwundung notwendig, wobei sich herausstellte, daß die vom Wundreiz betroffenen Zellen erst allmählich während des Wundheilungsprozesses kompetent für die Transformation wurden.

Behandlungen von TIF-infizierten Pflanzen mit Phytohormonen beeinflußten den zeitlichen Ablauf des Kompetentwerdens sowie die Tumormorphologie, nicht jedoch die Transformation selbst.

Histochemischer Nachweis und gelelektrophoretische Auftrennung von hitzestabilen Peroxidase-Isoenzymen ergaben eine Aktivitätserhöhung während der Wundheilungsvorgänge. Die TIF-Tumorausbildung war von einer zunächst niedereren Peroxidase-Aktivität, die in späteren Stadien wieder anstieg, gekennzeichnet.

O-Diphenol-Nachweise in situ, verbunden mit einer chromatographischen Analyse dieser Phenole im Extrakt, zeigten ein erhöhtes Vorkommen besonders von Chlorogensäure während des Wundheilungsprozesses und ebenso eine Zunahme dieser Diphenole im wachsenden Tumorgewebe.

Die Rolle von Phytohormonen, Oxidasen und o-Diphenolen wird unter morphogenetischen und wachstumsregulatorischen Gesichtspunkten am TIF-Tumor-System im Vergleich mit den Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen diskutiert.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS


AHUJA, M.R., 1967: Effect of gibberellic acid on genetically controlled tumor formation and vascularization in tomato. Nature 216, 800-801

AMES, I.H. 1970: Induction of tumor formation in Nicotiana amphiploids with triiodobenzoic acid. Can.J.Bot. 48, 2209-2212

AMES, I.H. 1971: Gibberellic acid: effect on genetic tumor induction. Can.J.Bot. 49, 1699-1701

AMES, I.H. 1974: Endogenous levels of auxin and tumorigenesis in a Nicotiana amphiploid. Plant Physiol. 54, 953-955

ANAND, V.K., HEBERLEIN, G.T. 1975: Effect of rifampin application time on crown-gall tumor induction by Agrobacterium tumefaciens. Can.J.Bot. 53, 2581-2588

ANDREAE, W.A., ANDREAE, S.R. 1953: Studies on indoleacetic acid metabolism. I. The effect of methyl umbelliferone, maleic hydrazide, and 2,4-D on indoleacetic acid oxidation. Can.J.Bot. 31, 426-437

ARNISON, P.G., BOLL, W.G. 1976a: The effect of 2,4D and kinetin on the morphology, growth, and cytochemistry of peroxidase of cotyledon

cell suspension cultures of bush bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender). Can.J.Bot. 54, 1847-1856

ARNISON, P.G., BOLL, W.G. 1976b: The effect of 2,4D and kinetin on peroxidase activity and isoenzyme pattern in cotyledon cell suspension cultures of bush bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender). Can.J.Bot. 54, 1857-1867

BATES, D.C., CHANT, S.R. 1970: Alterations in peroxidase isoenzymes in virus-infected plants. Ann.Appl.Biol. 65, 105-110

BAYER, M.H. 1977: Phytohormone und pflanzliche Tumorgenese. Beitr. Biol. Pflanzen 53, 1-54

BECK, E.G. 1949: The effect of wounding and heteroauxin on the development of crown gall on Impatiens balsamina. Am.J.Bot. 36, 793-794

BEIDERBECK, R. 1973: Wurzelinduktion an Blättern von Kalanchoe daigremontiana durch Agrobacterium rhizogenes und der Einfluß von Kinetin auf diesen Prozeß. Z.Pflanzenphysiol. 68, 460-467

BEIDERBECK, R. 1977: Pflanzentumoren. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

BEIDERBECK, R., BOPP, M. 1977: Pflanzenkrebs durch Änderung der Erbsubstanz? Umschau, 21, 698-703

BENAYOUN, J., ALONI, R., SACHS, T. 1975: Regeneration around wounds and the control of vascular differentiation. Ann.Bot. 39, 447-454

BENTLEY, J.A. 1961: Die Auxine. in: Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. XIV Herausgeber: W. Ruhland, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg

BERGMANN, L. 1964: Pflanzliche Tumoren und das Krebsproblem. Die Naturwissenschaften 14, 325-332

BIEBER, J. 1967: Einfluß der Wundheilung bei der Tumorbildung durch Agrobacterium tumefaciens. Phytopathology 59, 183-193

BIRECKA, H., CATALFAMO, J.L., URBAN, P. 1975: Cell wall and protoplast isoperoxidases in tobacco plants in relation to mechanical injury and infection with tobacco mosaic virus. Plant Physiol. 55, 611-619

BIRECKA, H., MILLER, A. 1974: Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid , and ethylene effects. Plant Physiol. 53, 569-574

BITANCOURT, A.A. 1954: La nature des auxines des tumeurs végétales. Ann.Biol. 30, 101-110

BLACK, L.M. 1945: A virus tumor disease of plants.
Am.J.Bot. 32, 408-415

BLACK, L.M. 1949: Virus tumors.
Survey of Biological Progress 1, 155-231

BLACK, L.M. 1951: Hereditary variations in the reaction of sweet clover to the wound tumor virus.
Am.J.Bot. 38, 256-267

BLACK, L.M. 1952: Plant virus tumors.
Ann. N.Y.Acad.Sci. 54 II, 1067-1075

BLACK, L.M. 1970: Wound tumor virus.
in: C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses 34

BLACK, L.M. 1972: Plant tumors of viral origin.
Progr. exp. Tumor Res. 15, 110-137

BLACK, L.M., LEE, C.L. 1957: Interaction of growth-regulating chemicals and tumefacient virus on plant cells.
Virology 3, 146-159

BLOCH, R. 1941: Wound healing in higher plants.
Bot.Rev. 7, 110-146

BOMHOFF, G.H., KLAPWIJK, P.M., KESTER, H.C.M., SCHILPEROORT, R.A., HERNALSTEENS, J.P., SCHELL, J. 1976: Octopine and nopaline: synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of Agrobacterium tumefaciens.
Mol.Gen.Genetics. 145, 177-181

BORTHWICK, H.A., HAMNER, K.C., PARKER, M.W. 1937: Histological and microchemical studies of the reaction of tomato plants to indoleacetic acid. Bot.Gaz. 98, 491-519

BOUILLENNE, C., GASPAR, T. 1970: Auxin catabolism and inhibitors in normal and crown gall tissues of Impatiens balsamina. Can.J.Bot. 48, 1159-1163

BRAUN, A.C. 1948: Studies on the origin and development of plant teratomas incited by the crown-gall bacterium. Am.J.Bot. 35, 511-519

BRAUN, A.C. 1952: The crown-gall disease. Ann.N.Y.Acad.Sci. 54 II, 1153-1161

BRAUN, A.C. 1959: Growth is affected. in: Plant pathology I. Horsfall and Diamond Academic Press. New York and London, 189-248

BRAUN, A.C. 1962: Tumor inception and development in the crown gall disease. Ann.Rev.Plant Physiol. 13, 533-558

BRAUN, A.C., MANDLE, R.J. 1948: Studies on the inactivation of the tumor inducing principle in crown gall. Growth 12, 255-269

BRAUN, A.C., STONIER, T. 1958: Morphology and physiology of plant tumors. Protoplasmatologia, Bd. X 5a, Springer Verlag, Wien

BRAUN, A.C., WOOD, H.N. 1962: On the inactivation of certain essential biosynthetic systems in cells of Vinca rosea L. Proc.Natl.Acad.Sci.US 48, 1776-1782

BROWN, S.A., TENNISWOOD, M. 1974: Abberrant coumarin metabolism in crown gall tumor tissue of tobacco. Can.J.Bot. 52, 1091-1094

COOK, M.T. 1923: Early stages of crown gall. Phytopathology 13, 476-482

CURTIS, C.R. 1971: Disc electrophoretic comparisons of proteins and peroxidases from Phaseolus vulgaris leaves infected with Agrobacterium tumefaciens. Can.J.Bot. 49, 333-337

DAME, F. 1938: Pseudomonas tumefaciens (Sm. et Towns.) Stev., der Erreger des Wurzelkropfes in seiner Beziehung zur Wirtspflanze. Zbl.Bakter. III, 98, 385-429

DARBYSHIRE, B. 1973: The glycoprotein nature of indoleacetic acid oxidase/peroxidase fraction and their development in pea roots. Physiol. Plant. 29, 293-297

DE CLEENE, M., DE LEY, J. 1976: The host range of crown gall Bot.Rev. 42, 389-466

DE JONG, D.W. 1967: An investigation of the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method. J. Histochem.Cytochem. 15, 335-346

DEZSI, L., PALFI, G., FARKAS, G.L. 1970: A new explanation for the increase in peroxidase activity in diseased and injured plant tissues. Phytopath.Z. 69, 285-291

DYE, M.H., CLARK, G., WAIN, R.L. 1962: Investigations on the auxins in tomato crown gall tissue. Proc. Roy.Soc., London. 155B, 478-492

EDREVA, A., COLAKOVA, N. 1975: Einige Fehler bei der Bestimmung von Eiweißmaterial nach der Lowrymethode. Fiziol.Rast., Moskva 22, 204-207

EICHIN, R. 1976: Agrobacterium tumefaciens (Smith and Townsend) Conn. als tumorinduzierendes Pflanzenpathogen. Diplomarbeit TU Hannover

EL KHALIFA, M.D., ABU REISH, B.I. 1975: Estimation of hyperauxiny during tumor formation in castor bean hypocotyls. Plant Cell Physiol. 16, 681-685

EL KHALIFA, M.D., LIPPINCOTT, J.A. 1968: The influence of plant factors on the initiation and growth of crown-gall tumors on primary pinto bean leaves. J.Expt.Bot. 19, 749-759

EMSWELLER, S.L., ASEN, S., UHRING, J. 1962: Tumor formation in interspecific hybrids of Lilium. Science 136, 266

ENGLER, G., HOLSTERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., HERNALSTEENS, J.P., SCHILPEROORT, R.A. 1975: Agrocin 84 sensitivity: a plasmid determinated property in Agrobacterium tumefaciens. Mol.Gen.Genetics 138, 345-349

FARKAS, G.J., STAHMANN, M.A. 1966: On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus. Phytopathology 56, 669-677

FRIČ, F. 1974: Peroxidase- und IES-Oxidaseaktivität in den Geweben von mehltaubefallener Gerste (Erysiphe graminis f. sp. hordei Marchal). Phytopath.Z. 80, 67-75

GALSTON, A.W., DALBERG, L.Y. 1954: The adaptive formation and physiological significance of IAAoxidase. Am.J.Bot. 41, 373-380

GALSTON, A.W. DAVIES, P.J. 1969: Hormonal regulation in higher plants. Science 163, 1288-1297

GASPAR, T., DINANT, M — 1966: Phenoloxidase, catalase, and peroxidase in plant extracts in relation to auxin catabolism. Wiss.Z. Univ. Rostock, Math.Naturw. Reihe 16, 441-442

GERLACH, D. — 1969: Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

GLIEM, G. — 1973: Untersuchungen über ein tumorauslösendes Prinzip in Nicotiana clevelandii. Diplomarbeit, Universität Bonn

GLIEM, G. — 1977: Plastidenentwicklung in transformierten Geweben von Nicotiana clevelandii x Nicotiana glutinosa Hybriden nach Tabak-Tumor Virus Infektion. Dissertation, Universität Bonn

GORDON, A.R. — 1968: Histochemical localization by differential inactivation of peroxidase isoenzymes and changes in isoenzyme distribution during development and wound healing in tomato stem. Case Western Reserve University, Ph.D.

GORDON, A.R., ALLDRIDGE, N.A. — 1971: Cytochemical localization of peroxidase A' in developing stem tissues of extreme dwarf tomato. Can.J.Bot. 49, 1487-1496

GORDON, S.A., PALEG, L.G. 1961: Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenols. Plant Physiol. 36, 838-845

HALL, J.L., SEXTON, R. 1972: Cytochemical localization of peroxidase acitivity in root cells. Planta 108, 103-120

HAMILTON, R.H., CHOPAN, M.N. 1975: Transfer of the tumor inducing factor in Agrobacterium. Biochem.Biophys. Res.Commun. 63, 349-354

HAMNER, K.C., KRAUS, E.J. 1937: Histological reactions of bean plants to growth promoting substances. Bot.Gaz. 98, 735-807

HARKIN, J.M., OBST, J.R. 1973: Lignification in trees: Indication of exclusive peroxidase participation. Science 180, 296-298

HENDERSON, J.H.M., BONNER, J. 1952: Auxin metabolism in normal and crown gall tissue of sunflower. Am.J.Bot. 39, 444-451

HENRY, E.W., VALDOVINOS, J.G., JENSEN, T.E. 1974: Peroxidases in tobacco abscission zone tissue. II. Time course studies of peroxidase activity during ethylene induced abscission. Plant Physiol. 54, 192-196

HEPLER, P.K., RICE, R.M., TERRANOVA, W.A. 1972: Cytochemical localization of peroxidase activity in wound vessel members of Coleus. Can.J.Bot. 50, 977-983

HESS, D. 1974: Pflanzenphysiologie. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

HILDEBRAND, A.C., RIKER, A.J. 1947: Influence of some growth regulating substances on sunflower and tobacco tissues in vitro. Am.J.Bot. 34, 421-427

JANAS, K.M. 1977: Polyphenols and inhibitors of indolyl-3-acetic acid oxidase in carrot roots infected with nothern root-knot nematode. Acta Agrobot. 30, 13-31

JENSEN, W. 1962: Botanical Histochemistry. W.H. Freeman and Company San Francisco

JOHNSON, G., SCHAAL, L.A. 1957: Chlorogenic acid and other orthodihydricphenols in scab-resistant Russet Burbank and scab-susceptible Triumph potato tubers of different maturities. Phytopathology 47, 253-255

JONES, S.G. 1947: An anatomical study of crown gall tumors on the Himalaya giant blackberry. Phytopathology 37, 613-624

JORDAN, M., FEUCHT, W. 1977: Differenzierungsprozesse und Phenolstoffwechsel bei in vitro kultivierten Antheren von Prunus avium und Prunus x'Pandora' Angew. Bot. 51, 69-76

KARSTEN, U. 1966: Kinetinartige Wirkungen von Tumoren an Bryophyllum daigremontianum. Flora, Abt. A, 156, 428-444

KELLY, S.M., BLACK, L.M. 1949: The origin, development, and cell structure of a virus tumor in plants. Am.J.Bot. 36, 65-73

KENDE, H., SITTON, D. 1967: The physiological significance of kinetin- and gibberellin-like root hormones. Ann.N.Y.Acad.Sci. 144, 235-243

KENTEN, R.H. 1955: The oxidation of IAA by wax-pod bean root sap and peroxidase systems. Biochem.J. 59, 110-121

KLEIN, R.M., LINK, G.K.K. 1952: Studies on the metabolism of plant neoplasms. V. Auxin as a promoting agent in the transformation of normal to crown-gall tumor cells. Proc.Natl.Acad.Sci. (Wash) 38, 1066-1072

KOBLITZ, H. 1961: Einige Bemerkungen zum histochemischen Nachweis von an der Verholzung beteiligten Fermenten. Ber.dtsch.bot.Ges. 74, 274-287

KORNAU, K. 1978: Untersuchungen über einen tumorinduzierenden Faktor in Tabakhybriden. Diplomarbeit, Universität Bonn

KOSTOFF, D. 1930: Tumors and other malformations on certain Nicotiana hybrids. Zbl.Bakter. Abt. III, 81, 244-260

KRAUS, E.J., BROWN, N.A., HAMNER, K.C. 1936: Histological reactions of bean plants to indoleacetic acid. Bot.Gaz. 98, 370-420

KULL, U. 1972: Wirkungen von Wuchsstoffen auf Speicherung und Stoffwechsel in vegetativen Pflanzenteilen. in: Botan.Studien Bd. 19 Herausgeber Troll, von Guttenberg, Verlag Gustav Fischer, Jena

KUPILA, S. 1956: Anatomical and cytological development of crown gall. Arch.Soc.Zool.Bot.Fennicae "Vanamo" 10, 38-50

KUPILA, S. 1958: Anatomical and cytological comparison of the development of crown gall in three host species. Ann.Bot.Soc. "Vanamo" 30, 1-89

KUPILA, S. 1963: Crown gall as an anatomical and cytological problem: a review. Can.Res. 23, 497-509

KUPILA-AHVENNIEMI, S., HUHTELIN, L. 1974: The effect of gibberellic acid on crown gall development. Aquilo.Ser.Bot. 12, 21-25

KUPILA, S., THERMAN, E. 1962: Anatomical observations on genetic tumors and crown gall in amphidiploid Nicotiana glauca x langsdorfii. Ann.Bot.Soc. "Vanamo" 32, 1-24

KUPILA-AHVENNIEMI, S. THERMAN, E. 1968: Morphogenesis of crown gall. Adv. in Morphogenesis 7, 45-78

LEDERBOER, M., KROL, A.J.M., DON, J.J.M. SPIER, F., SCHILPEROORT, R.A., ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., SCHELL, J. 1976: On the isolation of TI-plasmid from Agrobacterium tumefaciens. Nucleic Acids Res. 3, 449-463

LEE, C.L. 1955a: Virus-tumor development in relation to lateral-root and bacterical nodule formation of Melilotus alba. Virology 1, 152-164

LEE, C.L. 1955b: Anatomical changes in sweet clover shoots infected with wound tumor virus. Am.J.Bot. 42, 693-698

LEE, C.L. 1956: Virus tumor formation in roots of Capsella bursa-pastoris. Phytopathology 46, 140-145

LEE, C.L., BLACK, L.M. 1955: Anatomical studies of Trifolium incarnatum infected by wound tumor virus. Am.J.Bot. 42, 160-168

LEOPOLD, A.C., PLUMMER, T.H. 1961: Auxin-phenol complexes. Plant Physiol. 36, 589-592

LEVINE, M. 1923: Studies on plant cancers. V. Leafy crown galls on tobacco plants resulting from Bacterium tumefaciens inoculations. Phytopathology 13, 107-116

LEVINE, M. 1937: Tumors of tobacco hybrids. Am.J.Bot. 24, 250-256

LIPETZ, J. 1965: Crown gall tumorigenesis: Effect of temperature on wound healing and conditioning. Science 149, 865-867

LIPETZ, J. 1966: Crown gall tumorigenesis. II. Relation between wound healing and the tumorigenic response. Cancer.Res. 26, 1597-1605

LIPETZ, J. 1967: Wound healing in Kalanchoe. Ann.N.Y.Acad.Sci. 144, 320-325

LIPETZ, J., GALSTON, A.W. 1959: Indoleacetic acid oxidase and peroxidase activities in normal and crown gall tissue cultures of Parthenocissus tricuspidata. Am.J.Bot. 46, 193-196

LIPPINCOTT, J.A., LIPPINCOTT, B.B. 1975: The genus Agrobacterium and plant tumorigenesis. Ann.Rev.Microbiology 29, 377-405

LISON, L. 1960: Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars, Paris

LITTAU, V.C., BLACK, L.M. 1952: Spontaneous tumors in sweet clover. Am.J.Bot. 39, 191-194

LIU, S.-T., GRUENERT, D., KNIGHT, C.A. 1978: Bound form indole-3-acetic acid synthesis in tumorous and nontumorous species of Nicotiana. Plant Physiol. 61, 50-53

LOEBENSTEIN, G., LINDSEY, N. 1961: Peroxidase activity in virus infected sweet potatoes. Phytopathology 51, 533-537

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. RANDALL, R.J. 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275

MÄDER, M. 1974: Über Lokalisation und Regulation der Peroxidase Isoenzyme in differenzierenden Kalluskulturen von Nicotiana tabacum L. Dissertation, Universität Heidelberg

MÄDER, M., MEYER, Y., BOPP, M. 1975: Lokalisation der Peroxidase. Isoenzyme in Protoplasten und Zellwänden von Nicotiana tabacum L. Planta 122, 259-268

MÄDER, M., MEYER, Y., BOPP, M. 1976: Zellwandregeneration und Peroxidase-Isoenzym-Synthese isolierter Protoplasten von Nicotiana tabacum L. Planta 129, 33-38

MATTA, A., GENTILE, J.A. 1968: The relation between polyphenoloxidase activity and ability to produce indoleacetic acid in Fusarium-

infected tomato plants.
Neth.J.Pl.Path. 74, 47-51

MC KEEN, W.E. 1954: An anatomical study of cane and crown galls.
Can.J.Bot. 32, 527-530

MEUDT, W.J. 1967: Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase enzymes.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 144, 118-128

MINOCHA, S.C., HALPERIN, W. 1976: Enzymatic changes and lignification in relation to tracheid differentiation in cultured tuber tissue of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus).
Can.J.Bot. 54, 79-89

MISRA, A., NIENHAUS, F. 1976: Cultivation of tobacco callus tissue infected with tobacco tumor virus on complete and deficient media.
Phytopath.Z. 87, 187-189

NIENHAUS, F. 1969: Phytopathologisches Praktikum.
Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg

NIENHAUS, F., GLIEM, G. 1973: Evidence for a new mechanically transmissible tumor-inducing principle in tobacco.
Phytopath.Z. 78, 367-368

NIENHAUS, F., HOOGEN, H. 1970: Stoffwechselphysiologische Veränderungen in der Pflanze nach Virusinfektion unter Einfluß von Wundreiz. 2. Enzymaktivitätsbestimmungen nach Acrylamidgelelektrophorese. Phytopath.Z. 69, 38-48

OCKERSE, R., MUMFORD, L.M. 1973: The regulation of peroxidase activity by gibberellin and auxin in pea stem segments. Can.J.Bot. 51, 2237-2242

PEARSE, E.A.G. 1972: Histochemistry. Churchill Livingstone, Edinburgh Vol. I and II

PILET, P.E. 1964: Effect of chlorogenic acid on the auxin catabolism and the auxin content of root tissues. Phytochemistry 2, 617-621

PILET, P.E., GALSTON, A.W. 1955: Auxin destruction, peroxidase activity and peroxide genesis in the roots of Lens culinaris. Physiol. Plant. 8, 888-898

PRYOR, T., SCHWARTZ, D. 1973: The genetic control and biochemical modification of catechol oxidase in maize. Genetics 75, 75-92

RAA, J. 1973: Cytochemical localization of peroxidase in plant cells. Physiol. Plant. 28, 132-133

RABIN, R.S., KLEIN, R.M. 1957: Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indoleacetic acid oxidase. Arch.Biochem.Biophys. 70, 11-15

RACK, K. 1954: Untersuchungen über die Bedeutung der Verwundung und über die Rolle von Wuchsstoffen beim bakteriellen Pflanzenkrebs. Phytopath.Z. 21, 1-44

REEVE, R.M. 1959: Histological and histochemical changes in developing and ripening peaches. I. The catechol tannins. Am.J.Bot. 46, 210-217

RIDGE, I., OSBORNE, D.J. 1970: Hydroxyprolin and peroxidase in cell walls of pisum sativum: Regulation by ethylene. J.Exp.Bot. 21, 843-856

RIKER, A.J. 1923: Some morphological responses of the host tissue to the crown gall organism. J.Agr.Res. 26, 425-435

SACHS, T. 1975: Plant tumors resulting from unregulated hormon synthesis. J.theor.Biol. 55, 445-453

SCHAEFFER, G.W., BUTA, J.G., SHARPE, F. 1967: Scopoletin and polyphenol-induced lag in peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. Plant Physiol. 20, 324-347

SCHIPPER, A. 1975: Changes in dehydrogenase and peroxidase activities of aspen infected with Hypoxylon mammatum.

SCHMIEDEKNECHT, M. 1974: Anatomie und Histologie der kranken Pflanze. in: Klinkowski, Mühle, Reinmuth, Bochow: Grundlagen und allgemeine Probleme der Phytopathologie und des Pflanzenschutzes. Academie Verlag, Berlin

SCHRAUWEN, J. 1966: Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamid-Säulchen. J.Chromatogr. 23, 177-180

SEQUEIRA, L. 1963: Growth regulators in plant disease. Ann.Rev.Phytopath. 1, 5-30

SHEEN, S.J., ANDERSON, R.A. 1974: Comparison of polyphenols and related enzymes in the capsule and nodal tumor of Nicotiana plants. Can.J.Bot. 52, 1379-1385

SIEGEL, B.Z., GALSTON, A.W. 1967: Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. Science 157, 1557-1558

SINGH, R., SINGH, D. 1974: Effect of temperature on peroxidase, polyphenol oxidase, and catalase isoenzymes during germination of tall and dwarf wheat (Triticum aestivum Linn.). Biochem.Physiol.Pflanzen 166, 469-474

SKOOG, F. 1944: Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Am.J.Bot. 31, 19-24

STAHL, E. 1967: Dünnschichtchromatographie. 2. Auflage Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

SKOOG, F., MILLER, C.O. 1957: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp.Soc.Biol. 11, 118-131

SMITH, H.H. 1972: Plant genetic tumors. Progr.exp.Tumor Res. 15, 138-164

SPURR, H.W., HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J. 1965: The integral association of chlorogenic acid to crown gall tumor formation. Phytopathology 55, 1004-1008

SRIDHAR, R. 1978: Changes in peroxidase isoenzymes in blast diseased rice leaves. Acta Phytopathol.Hung. 13, 161-164

SRIVASTAVA, O.P., VAN HUYSTEE, R.B. 1973: Evidence for a close association of peroxidase, polyphenol oxidase, and IAA oxidase isoenzymes of peanut suspension culture medium. Can.J.Bot. 51, 2207-2215

SRIVASTAVA, O.P., VAN HUYSTEE, R.B. 1977: An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase, and polyphenol oxidase from peanut cells. Can.J.Bot. 55, 2630-2635

STAPP, C. 1956: Bakterielle Pflanzenkrankheiten.
in: Handbuch der Pflanzenkrankheiten Bd. II
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg

STRAUS, W. 1964: Factors affecting the cytochemical reaction of peroxidase with benzidine and the stability of the blue reaction product.
J.Histochem.Cytochem. 12, 462-469

SYLWESTER, E.P., COUNTRYMAN, M.C. 1933: A comparative histological study of crown gall and wound callus on apple.
Am.J.Bot. 20, 328-340

TANAKA, Y., URITANI, I. 1977: Polarity of production of polyphenols and development of various enzyme activities in cut-injured sweet potato root tissue.
Plant Physiol. 60, 563-566

TEMPÉ, J., PETIT, A., HOLSTERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. 1977: Thermosensitive step associated with transfer of the TI plasmid during conjugation possible relation to transformation in crown gall.
Proc.Natl.Acad.Sci.US 74, 2848-2849

THERMAN, E. 1956: Dedifferentiation and differentiation of cells in crown gall of Vicia faba.
Caryologia 8, 325-348

TSO, T.C., DIETERMAN, L.J., WENDER, S.H. 1964: Scopoletin, scopolin and chlorogenic acid in tumorous of interspecific Nicotiana hybrids. Nature 204, 779-780

TSO, T.C., SOROKIN, T.P., CHU, H., SCHAEFFER, G.W., BURK, L.G. 1967: Nitrogenous and phenolic compounds of Nicotiana plants. II. Selective incorporation of aromatic amino acids in phenolic compounds of tumorous Nicotiana hybrids. Bot.Bull.Acad.Sinica 8, 231-238

TURETSKAYA, R.K., KEFELI, V.J. 1963: Certain properties of natural inhibitors in plant growth. Fiziol.Rast., Moskva 10, 98-104

VAN DUIJN, P. 1955: An improved histochemical benzidine-blue peroxidase method and a note on the composition of the blue reaction product. Rec.Trav.Chim.Pays Bas 74, 771-778

VAN FLEET, D.S. 1952: Histochemical localization of enzymes in vascular plants. Bot.Rev. 18, 354-398

VAN FLEET, D.S. 1959: Analysis of the histochemical localization of peroxidase related to the differentiation of plant tissues. Can.J.Bot. 37, 449-458

VAN LAREBEKE, N., GENETELLO, C., SCHELL, J., SCHILPEROORT, R.A., HERMANS, A.K., HERNALSTEENS, J.P., VAN MONTAGU, M. 1974: Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability. Nature 252, 169-170

VAN LAREBEKE, N., GENETELLO, C., SCHELL, J., SCHILPEROORT, R.A., HERMANS, A.K., HERNALSTEENS, J.P., VAN MONTAGU, M. 1975: Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic Agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature 255, 742-743

VAN LOON, L.C. 1971: Tobacco polyphenoloxidases: a specific staining method indicating non-identity with peroxidases. Phytochemistry 10, 503-507

VOGEL, S. 1976: Untersuchungen zum Wirtspflanzenkreis des Tabak-Tumorvirus. Diplomarbeit, Universität Bonn

VOM BERGE UND HERRENDORFF, E, 1977: Beeinflussung von Virussynthese und Tumorentwicklung in Nicotiana clevelandii-Hybriden durch Actinomycin D nach Tabaktumorvirus-Infektion. Diplomarbeit, Universität Bonn

WATSON, B., CURRIER, T.C., GORDON, M.P., CHILTON, M.D., NESTER, E.W. 1975: Studies on a plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J.Bacteriol. 123, 255-264

WEGEN, H.-W. 1976: Beobachtungen über Oxidase-Aktivitäten in Tumorgewebe von Nicotiana-Pflanzen nach Tumorvirus-Infektion. Diplomarbeit, Universität Bonn

WEGEN, H.-W. 1979: Veränderungen von Oxidase-aktivitäten und phenolischen Inhaltsstoffen in Extrakten aus Tumorgewebe von Tabak-hybriden. Dissertation, Universität Bonn

WESTSTEIJN, E.A. 1976: Peroxidase activity in leaves of Nicotiana tabacum var. Xanthi nc. before and after infection with tobacco mosaic virus. Physiol.Plant.Path. 8, 63-71

WOOD, H.N., BRAUN, A.C. 1961: Studies on the regulation of certain essential bio-synthetic systems in normal and crown gall tumor cells. Proc.Natl.Acad.Sci.US 47, 1907-1913

WOOD, H.N., BRAUN, A.C. 1967: The role of kinetin (6-furfurylaminopurine) in promoting division in cells of Vinca rosea L. Ann.N.Y.Acad.Sci. 144, 244-250

ZENK, M.H., MÜLLER, G. 1963: In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occuring phenolic acids. Nature 200, 761-763

ZUCK, R.K. 1975: Induction of crown gall without bacterial contact but with living bacteria. XII Intern.Bot.Congress Leningrad

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof.Dr.F. Nienhaus, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof.Dr.H.G. Trüper danke ich sehr für seine Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Herrn Prof.Dr.B. Stille und Herrn Prof.Dr.J. Krämer gilt mein besonderer Dank für die Überlassung einer Stelle als Wissenschaftliche Hilfskraft.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Pflanzenkrankheiten danke ich Herrn Prof.Dr.H.C. Weltzien.

Allen Institutsangehörigen und Kondoktoranden, insbesondere Frau Ch. Mack und Fräulein R. Sustmann, die mich durch ihre Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich herzlich danken.

LEBENSLAUF

Am 6. Februar 1952 wurde ich als ältestes von drei Kindern des Verm.-Ing. Hans-Leo Streit und seiner Ehefrau Margarete, geb. Schrenk, in Trier geboren. Mein Vater verstarb 1959.
Von 1958 bis 1962 besuchte ich die katholische Volksschule St. Martin und von 1962 bis 1970 das Staatliche Auguste-Viktoria-Gymnasium in Trier. Am 12. Juni 1970 bestand ich dort die Reifeprüfung.
Zum Wintersemester 1970/71 immatrikulierte ich mich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn für die Fächer Biologie und Geographie. Am 1. Juli 1975 legte ich die erste Staatsprüfung für das Lehramt am Gymnasium ab.
Im Oktober 1975 begann ich mit der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.F. Nienhaus in der virologischen Abteilung des Instituts für Pflanzenkrankheiten der Landwirtschaftlichen Fakultät, Bonn. Gleichzeitig nahm ich an einem Aufbaustudium in Phytomedizin teil. Zum 1. September 1978 trat ich als Stud. ref. in den Schuldienst ein.
Seit dem 29. Juni 1979 bin ich mit Rüdiger Glase verheiratet.